

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Jana Chaloupecká

Odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom

Glycocalyx shedding by cercariae of bird schistosomes

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Praha 2012

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 8. 2012

.....

Poděkování

Nejvíce ze všeho bych chtěla poděkovat svému školiteli Liboru Mikešovi. Děkuji mu za jeho odborné rady a cenné připomínky, které mě z jeho strany provázely celé mé magisterské studium a za jeho trpělivost a vstřícnost.

Velký dík patří všem členům helmintologické laboratoře za jejich přátelskou povahu a ochotu s čímkoliv a kdykoliv poradit. Jmenovitě děkuji Janě Bulantové za pomoc na experimentech hodnocených pomocí TEM. Líbě a Páje za společnost při experimentech s kačenkami a za morální podporu při sepisování této práce.

Děkuji prof. V. Hořejšímu za poskytnutí protilátky anti-CD15. Honzovi Dvořákovi a Petře Kolbekové za poskytnutí cercárií *Schistosoma mansoni*. Svým spolubydlícím a kamarádům děkuji za relaxaci a podporu při učení během celého mého vysokoškolského vzdělání. Můj největší dík patří rodičům, kteří mě během studia vždy plně podporovali, i když to někdy se mnou neměli jednoduché.

Abstrakt

Trichobilharzia spp. jsou ptačí schistosomy příbuzné lékařsky významným lidským parazitům rodu *Schistosoma*. Penetrující cercárie jsou dobře známy jako kauzativní agens cercáriové dermatitidy u lidí.

Cercárie aktivně penetrují kůži definitivního hostitele a transformují se na schistosomula. Tomuto procesu předchází odhození ocásku, dochází k vyprázdnění penetračních žláz a rozsáhlým povrchovým změnám. Jednou z těchto změn je ztráta vysoce imunogenního glykokalyxu, který představuje ochrannou vrstvu ve vodním prostředí. Glykokalyx má specifické složení sacharidových molekul, které jsou vázány k lipidům nebo proteinům membrány tegumentu. O mechanismu jeho odvrhování je poměrně málo informací. Hypotézy jsou založeny na nepřímých důkazech, které navrhuji účast peptidáz nebo (fosfo)lipáz z penetračních žláz.

Tato práce popisuje změny v povrchové glykosylaci během transformace cercárií na schistosomula pomocí fluorescenčně značených lektinů a monoklonálních protilátek proti Lewis X antigenu. Lektiny UEA-I, LTA a PNA byly zvoleny jako markery transformace u *T. regenti*.

Dále se tato práce zabývá odvrhováním glykokalyxu cercárií. Při indukci *in vitro* vyprazdňování penetračních žláz a značení obsahu žláz jsme pozorovali silnou vazbu sekretů z cirkum- a postacetabulárních žláz na povrch cercárií *T. szidati* a *T. regenti*. Cercárie se nejprve obsahem penetračních žláz obalily a během krátké doby docházelo k odvržení sekretů z povrchu a zanechání tohoto materiálu za tělem cercárie v podobě tunelu. Reaktivita cercárií s fluorescenčně značenými lektiny na jejich povrchu se významně měnila při porovnání situací před a po indukci vyprazdňování žláz. Po reakci s obsahem žláz se lektiny na povrch cercárií již nevázaly; docházelo k odvržení glykokalyxu. Tento proces byl také indukován samotnými lektiny, hlavně se specifitou k fukose.

V souvislosti s předchozími experimenty jsme sledovali vliv aktivní rekombinantní formu katepsinu B2, přítomného v postacetabulárních žlázách cercárií, a inhibitorů cysteinových, serinových a metalopeptidáz pro jejich schopnost indukce anebo inhibice odvrhování glykokalyxu. Pro další výzkum molekul pravděpodobně se účastnících tohoto procesu je charakterizován proteom penetračních žláz cercárií.

Klíčová slova:

Motolice, cercárie, glykokalyx, peptidáza, lipáza, glykoprotein, glykolipid, lektin, penetrace, *Trichobilharzia*, *Schistosoma*

Abstract

Trichobilharzia spp. are avian schistosomes related to medically important human parasites of the genus *Schistosoma*. Penetrating cercariae are well known as causative agent of cercarial dermatitis in humans.

Cercariae actively penetrate the skin of definitive hosts and transform into schistosomula. This process is preceded by cercarial tail detachment and includes emptying of penetration glands and extensive surface changes. One of these changes is the loss of highly immunogenic glycocalyx which represents a protective coat in the aquatic environment. The glycocalyx has specific composition of saccharide molecules which are bound to lipids or proteins on the membrane of cercarial tegument. There is only limited information about the mechanism of shedding. Hypotheses based on indirect evidences suggest that peptidases or (phospho)lipases from penetration glands could be involved.

This work describes the changes in surface glycosylation during transformation of cercariae into schistosomula by fluorescently labelled lectins and monoclonal antibodies against Lewis X antigen. Lectins UEA-I, LTA and PNA have been chosen as markers of transformation of *T. regenti*.

Further, our experiments have been focused on shedding of cercarial glycocalyx. During *in vitro* induction of penetration gland emptying and staining of the gland content, we observed strong binding of the circum- and postacetabular secretions to the surface of cercariae of *T. szidati* and *T. regenti*. The cercariae were able to shed this material from their surface within a short time. The reactivity of cercariae with fluorescent lectins binding to their surface dramatically changed comparing the situations before and after induction of gland emptying. After the reaction with gland content, the surface did not bind these lectins anymore; this means that the glycocalyx has been shed. This process is also induced by lectins alone, especially with those possessing fucose specificity.

In context with previous experiments we tested an active recombinant form of cathepsin B2 present in postacetabular glands of cercariae and the cysteine, serine or metallopeptidase inhibitors for their ability to trigger and inhibit glycocalyx shedding, respectively. For further research of molecules putatively involved in this process, the proteome of cercarial penetration glands is being characterized.

Key words:

Trematode, cercaria, glycocalyx, peptidase, lipase, glycoprotein, glycolipid, lectin, penetration, *Trichobilharzia*, *Schistosoma*

Obsah

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1 Charakteristika ptačích schistosom rodu <i>Trichobilharzia</i> se zaměřením na druh <i>Trichobilharzia regenti</i>	2
2.1.1 Morfologie cercárií a povrch těla schistosom	3
2.1.2 Ontogeneze schistosom se zaměřením na proces penetrace a transformace cercárie na schistosomulum	4
2.1.2.1 Penetrace cercárie do definitivního hostitele	4
2.1.2.2 Transformace cercárie na schistosomulum se zaměřením na změny ve stavbě povrchu těla	6
2.2 Žlázy u cercárií schistosom	7
2.2.1 Acetabulární (penetrační) žlázy	7
2.2.1.1 Cirkumacetabulární žlázy	9
2.2.1.2 Postacetabulární žlázy	10
2.2.2 Hlavová žláza	11
2.3 Glykokalyx cercárií schistosom	12
2.3.1 Ultrastruktura a molekulární složení glykokalyxu	13
2.3.1.1 Lewis X antigen	15
2.3.2 Mechanismus odvrhování glykokalyxu cercárií při transformaci na schistosomula	16
2.3.3 Molekuly podílející se na odvrhování glykokalyxu	18
2.4 Lektiny	18
2.4.1 Charakteristika lektinů a jejich využití	18
2.4.2 Mannose binding lectin (MBL)	20
3 MATERIÁL A METODIKA	21
3.1 Laboratorní modely	21
3.2 Roztoky, pufrý a lektiny	21
3.3 Izolace cercárií z vodních plžů	23
3.4 Infekce definitivních hostitelů	23
3.5 Sběr schistosomul a dospělců <i>T. regenti</i>	24
3.6 <i>In vitro</i> kultivace schistosomul <i>T. regenti</i>	24
3.7 Izolace a sběr rozpustných exkrečně-sekrecních produktů cercárií <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	25
3.7.1 Indukce vyprazdňování penetračních žláz cercárií a sběr exkrečně-sekrecních produktů	25
3.7.2 Měření koncentrace proteinů	25
3.7.3 Lyofilizace	25
3.7.4 Proteomická analýza	26

3.8 Využití světelné a fluorescenční mikroskopie při studiu odvrhování glykokalyxu cerkárií ptačích schistosom	26
3.8.1 Barvení obsahu penetračních žláz cercárií.....	26
3.8.2 Charakterizace sacharidových epitopů na povrchu cercárie pomocí fluorescenčně značených lektinů	27
3.8.3 Charakterizace sacharidových epitopů různě starých schistosomul <i>T. regenti</i> pomocí fluorescenčně značených lektinů	28
3.8.4 Podíl lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a na stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti in vitro</i>	28
3.8.5 Vliv sacharidových inhibitorů lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a na stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti in vitro</i>	29
3.8.6 Vazba lektinů, alizarinu a lithium karmínu na sekrety penetračních žláz cerkárií <i>T. regenti</i>	32
3.8.7 Značení sekretů penetračních žláz pomocí CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester).....	32
3.9 Vliv aktivní rekombinantní formy katepsinu B2 na odvrhování glykokalyxu u cerkárií <i>T. regenti</i>	33
3.10 Vliv inhibitorů peptidáz na odvrhování glykokalyxu	34
3.11 Imunocytochemie	35
3.12 Elektronová mikroskopie.....	36
3.12.1 Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM).....	36
4 VÝSLEDKY	37
4.1 Sběr rozpustných exkrečně-sekrečních produktů cercárií <i>T. regenti</i> a <i>T. szidati</i>	37
4.1.1 Měření koncentrace proteinů.....	37
4.1.2 Proteomická analýza	37
4.2 Studium odvrhování glykokalyxu cercárií ptačích schistosom pomocí světelné a fluorescenční mikroskopie	37
4.2.1 Barvení obsahu penetračních žláz cercárií.....	37
4.2.2 Charakterizace sacharidových epitopů na povrchu cercárie pomocí fluorescenčně značených lektinů	41
4.2.3 Charakterizace sacharidových epitopů různě starých schistosomul <i>T. regenti</i> pomocí fluorescenčně značených lektinů	44
4.3 Role lektinů při indukci vyprazdňování penetračních žláz a při stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti in vitro</i>	47
4.4 Vliv sacharidových inhibitorů lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti in vitro</i>	51
4.5 Vazba lektinů, alizarinu a lithium karmínu na sekrety penetračních žláz cercárií	54
4.6 Vazba CFSE na povrch a sekrety penetračních žláz cercárií <i>T. regenti</i>	56

4.7 Vliv rekombinantní formy katepsinu B2 na odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>Trichobilharzia regenti</i>	56
4.8 Vliv inhibitorů různých katalytických skupin peptidáz na odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti</i>	58
4.9 Lokalizace Lewis X antigenu na povrchu jednotlivých stádií <i>T. regenti</i>	58
4.10 Studium odvrhování glykokalyxu pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM)	63
5 DISKUSE.....	65
5.1 Charakterizace změn v glykosylaci povrchu cercárií <i>T. regenti</i> při transformaci na schistosomula	65
5.2 Odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom.....	68
5.3 Charakterizace molekul zapojených v odvrhování glykokalyxu u cercárií <i>T. regenti</i> ...	74
6 ZÁVĚR	77
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	79

Seznam použitých zkratek

BSA – bovinní sérum albumin
CB2 – katepsin B2
CD15 – Lewis X antigen
CD15s – sialylovaný Lewis X antigen
CFSE, CFDA-SE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CRD – carbohydrate recognition domain (vazebné místo rozpoznávající sacharidy)
DMSO – dimethylsulfoxid
E-64 – trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane
E-64c – syntetický analog E-64 (membránou neprocházející)
E-64d – membránou propustným analog inhibitoru E-64c
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA – ethylenglykolocotová kyselina
E-S – exkrečně-sekreční
FITC – fluorescein-5-izothiokyanát
GPI - glykosylfosfatidylinositolová kotva
HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
chMBL – mannose binding lectin izolovaný z kuřecího séra
IgM – imunoglobulin M
LacdiNAc – N,N'- diacetyl laktosamin (GalNac β 1 \rightarrow 4GlcNAc)
Le^x – Lewis X antigen
MASP – MBL-associated serine proteases
MBL – mannose binding lectin
PBS – fosfátový pufr se 150 mM NaCl
p.i. – po infekci
S. – *Schistosoma*
SCM 169 – kultivační médium pro schistosomy 169
SEM – skenovací elektronová mikroskopie
Ser – serin
ShCE – cercariální elastáza *Schistosoma haematobium*
SjCE – cercariální elastáza *Schistosoma japonicum*
sLe^x – sialylovaný Lewis X antigen
SmCE – cercariální elastáza *Schistosoma mansoni*
SSEA-I – stádiově specifický embryonální antigen (stage specific embryonic antigen-I)

T. – Trichobilharzia

TEM – transmisní elektronová mikroskopie

Thr – threonin

TLCK – N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, hydrochloride

TRITC – tetramethylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát

Sacharidy

Fuc – L-fukosa

Glc – D-glukosa

GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin

Gal – D-galaktosa

GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin

Lac – α -laktosa

Man – D-manosa

Mel – melibiosa (disacharid Gal α 1 \rightarrow 6Glc)

MetGlc – α -D-methylglukopyranosid

MetMan – α -D-methylmanopyranosid

NeuNAc – N-acetylneuraminová kyselina

poly-LacNAc – poly-N-acetylglukosamin

Lektiny (bližší charakteristika viz tabulka 1)

Con A – *Canavalia ensiformis*

GSL-I – *Griffonia simplicifolia*

HPA – *Helix pomatia*

JAC – *Artocarpus integrifolia*

LCA – *Lens culinaris*

LTA – *Lotus tetragonolobus*

PNA – *Arachis hypogaea*

PSA – *Pisum sativum*

RCA-I – *Ricinus communis*

SBA – *Glycine max*

STA – *Solanum tuberosum*

UEA-I – *Ulex europaeus*

WGA – *Tritium vulgare*

1 Úvod a cíle práce

Ptačí schistosomy rodu *Trichobilharzia* způsobují u definitivních hostitelů onemocnění zvané trichobilharzióza, které se projevuje závažnými zdravotními komplikacemi. U nespecifických hostitelů (savců včetně člověka) způsobují penetrující cercárie zánětlivé kožní onemocnění, cercáriovou dermatitidu. Toto onemocnění je na vzestupu, a to nejen v České republice (Horák a Kolářová 2011). Dosud není jasné, zda schistosomula ptačích schistosom při primoinfekcích nespecifických hostitelů pronikají z kůže dále do těla těchto hostitelů, kde by mohla způsobovat zdravotní komplikace svou migrací.

Během penetrace do definitivního hostitele se cercárie transformují na schistosomula. Tělo cercárie přitom prochází četnými ultrastrukturálními a molekulárními změnami, které se týkají i povrchu tegumentu. Tato práce je zaměřena na ztrátu silné vrstvy vysoce imunogenního glykokalyxu, který pro cercárie představuje ochrannou bariéru ve vodním prostředí. O mechanismu odvrhování glykokalyxu je poměrně málo informací, teoretická je možnost indukce tohoto procesu proteolytickými enzymy z penetračních žláz.

Odvrhování glykokalyxu u cercárií schistosom je doposud velmi málo probádaná oblast. Publikací na toto téma je poměrně málo a často se značně diskutabilními informacemi. Většina hypotéz věnujících se tomuto tématu se pohybuje pouze v rovině teoretických úvah a praktických důkazů je málo. Naše práce je zaměřena na odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom druhů *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati* a navazuje na mou bakalářskou práci (Chaloupecká 2010), která detailně shrnuje dostupné informace o vzniku, ultrastruktuře, chemickém složení, funkcích a mechanismu odvrhování glykokalyxu u cercárií motolic. Bližší charakterizace změn v povrchové glykosylaci v průběhu transformace a výzkum založený na porozumění odvrhování glykokalyxu může pomoci v pochopení tohoto složitého procesu nejen u ptačích schistosom.

Cíle práce:

- 1) Charakterizace změn v glykosylaci povrchu cercárií *T. regenti* při transformaci na schistosomula.
- 2) Popis průběhu odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom se zaměřením na druh *T. regenti*. Sledování vlivu katepsinu B2 a vybraných inhibitorů peptidáz na odvrhování glykokalyxu.
- 3) Sběr obsahu penetračních žláz cercárií *T. regenti* a *T. szidati* a jeho proteomická analýza.

2 Literární přehled

2.1 Charakteristika ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* se zaměřením na druh *Trichobilharzia regenti*

Rod *Trichobilharzia* je považován za největší rod čeledi Schistosomatidae. Parazité této čeledi většinou obývají oběhový systém teplokrevných obratlovců. Zástupci rodu *Schistosoma* patří mezi závažné patogeny lidí v tropických a subtropických oblastech. Tato práce je zaměřena na zástupce rodu *Trichobilharzia*, který zahrnuje přes 40 druhů ptačích parazitů. Je charakteristický svým kosmopolitním rozšířením, včetně oblastí s chladným podnebím (Blair a Islam 1983, Kolářová a kol. 1999, Horák a kol. 2002). Zástupci celé čeledi mají dvouhostitelské životní cykly. Definitivními hostiteli jsou u rodu *Trichobilharzia* ptáci. Spektrum ptačích definitivních hostitelů je širší, než spektrum mezihostitelů. Mezihostiteli jsou plicnatí plži, kteří jsou napadáni miracidii. Uvnitř plžů vzniká z miracidia mateřská sporocysta a z té následně sporocysty dceřiné, které dávají vzniknout furkocerkáriím.

Furkocerkárie ptačích schistosom uvolněné z mezihostitelských plžů způsobují při penetraci do nespecifických hostitelů (savců včetně člověka) cercáriovou dermatitidu. Klinické příznaky této dermatitidy se projevují především při opakovaných kontaktech (senzitivizace hostitele) s cercáriemi některých druhů schistosom (Olivier 1949, Horák a kol. 2002). Důvodem penetrace cercárií do nespecifických hostitelů je přítomnost stejných stimulů penetrace u ptačích i savčích hostitelů. Experimentální infekce ukazují, že cercárie, které penetrovaly do nespecifických hostitelů, nikdy v těchto hostitelích nedospívají; buď jsou eliminovány v kůži, nebo v průběhu migrace tělem nespecifického hostitele (Horák a kol. 1999, 2002).

Ptačí schistosomy rodu *Trichobilharzia* jsou děleny do 2 skupin dle definitivní lokalizace dospělců, kteří obývají buď viscerální oblasti (např. *T. szidati*, *T. franki*) nebo nazální tkáň (např. *T. regenti*, *T. australis*) svého specifického hostitele (Blair a Islam 1983, Horák a kol. 2002). Viscerální druhy migrují krevním řečištěm hostitele, naproti tomu nazální druh *T. regenti* má neurotropní typ migrace. Tento typ migrace je reprezentován vstupem parazita do periferních nervů a následnou migrací skrze centrální nervový systém (míchou a mozkem) až do nazální tkáně (cílová lokalita). Neurotropní migrace často vedou ke vzniku neuromotorických poruch. Například mohou způsobit paralýzy končetin u specifických i nespecifických hostitelů (Horák a kol. 1999, 2002, Hrádková a Horák 2002). Parazité nazální dutiny reprezentují minoritní skupinu uvnitř rodu *Trichobilharzia*. Do dnešní doby bylo

popsáno 8 nazálních druhů v rámci tohoto rodu, včetně *T. regenti* (Horák a kol. 1998a). Dospělci viscerálních druhů obydíjí cévy krevního řečiště (portální nebo mezenterické žíly), kde kladou vajíčka. Výjimkou jsou dospělci druhu *T. szidati*, kteří opouštějí krevní řečiště a jsou lokalizováni ve tkáni ve stěně střeva svých hostitelů (Neuhaus 1952).

Infekce ptačích hostitelů těmito schistosomami způsobují onemocnění zvané trichobilharzióza; je to srovnatelné onemocnění se schistosomózou u lidí. Také toto onemocnění může způsobovat vážné zdravotní komplikace způsobené migrací dospívajících helmintů tělem hostitele (ať už specifického či nespecifického), důležitým patogenním agens u definitivních hostitelů jsou vajíčka (Horák a kol. 2002).

2.1.1 Morfologie cercárií a povrch těla schistosom

Cerkárie schistosom jsou krátkověká, volně se pohybující larvální stádia žijící ve vodním prostředí. Po nalezení vhodného definitivního hostitele do něj aktivně penetrují. Cerkárie se skládá ze dvou částí: těla a ocásku. Vidličnatý ocásek cercárií je tvořen ze šikmo uspořádané svaloviny a je vyplněný hvězdovitými buňkami (Horák a kol. 1998a). Ocásek slouží jako orgán pohybu ve vodním prostředí a je odvržen v průběhu penetrace cercárie do definitivního hostitele pomocí svalového límce v zadní části těla (Haas a van de Roemer 1998).

Tělní část cercárie se v průběhu penetrace přeměňuje na schistosomulum, které migruje tělem definitivního hostitele a dospívá. Ocásek i tělní část cercárie jsou kryté tegumentem s trny. Tegument cercárií *Schistosoma mansoni* je struktura silná asi 0,5 µm na tělním segmentu a 0,2 µm na ocásku. Povrchová membrána tegumentu je třívrstevná a silná okolo 7 nm. Nad tegumentem leží fibrilární vrstva, glykokalyx (Morris 1971, Hockley 1973, Samuelson a Caulfield 1985, Horák a kol. 1998a, 1998b, Dorsey a kol. 2002).

V první polovině tělní části cercárií bývají u trichobilharzií přítomny dvě pigmentované oční skvrny. Tyto fotoreceptory jsou struktury podobné čočce, která je obklopena pigmentovanými buňkami (van de Roemer a Haas 1984). Z tohoto důvodu mají cercárie ptačích schistosom velmi dobře vyvinuté fototaktické reakce (Neuhaus 1952).

Přední konec těla cercárie je vyplněn svalnatým hlavovým orgánem, skrz který vedou vývody a vyústění penetračních žláz. Cerkárie mají pět párů penetračních žláz: dva páry jsou lokalizovány okolo acetabula a tři páry postacetabulárních žláz vyplňují zadní část těla. Žlázy se liší ve svém obsahu (o penetračních žlázách více v kapitole 2.2.1). Kromě hlavních penetračních žláz jsou v těle cercárie přítomny další menší žlázy. Acetabulum leží za středem těla cercárie (Neuhaus 1952, Horák a kol. 1998a, 2002).

Cerkárie mají prekursor trávicí soustavy, která je reprezentována dvěma krátkými větvemi střeva, které zasahují jen k cirkumacetabulárním žlázám. Trávicí soustava cercárií je nefunkční, a proto ve vodním prostředí nepřijímají potravu. Jejich hlavním zdrojem energie je glykogen, který cercárie syntetizují během vývoje v meziphostiteli. Velikost zásob glykogenu ovlivňuje délku života cercárie po uvolnění z plže (Horák a kol. 1998a, Dorsey a kol. 2002).

Povrch těla schistosom je, stejně jako u ostatních motolic, tvořen tegumentem (neodermis), který vzniká již při přeměně miracidia na mateřskou sporocystu. Neodermis se od tohoto okamžiku vyskytuje u všech následujících stádií (Meuleman a kol. 1978). Tegument se například účastní trávení a absorpce živin, syntézy, sekrece, exkrece a osmoregulace. Důležitá je jeho role v ochraně povrchu motolic proti enzymům a imunitním reakcím. Tegument je tvořen vnější cytoplazmatickou membránou, vnější bezjadernou vrstvou cytoplazmy, cytoplazmatickými spoji lemovanými mikrotubuly a buněčnými těly s jádry (tzv. subtegumentální buňky). Bezjaderná vrstva cytoplazmy tegumentu je granulární, obsahuje malé mitochondrie a inkluzní tělíska různých tvarů. Tegument je prostoupen nervovými buňkami, které na povrchu tvoří senzorické papily (Hockley 1973, Cousin a kol. 1981, Sobhon a Upatham 1990, Dorsey a kol. 2002).

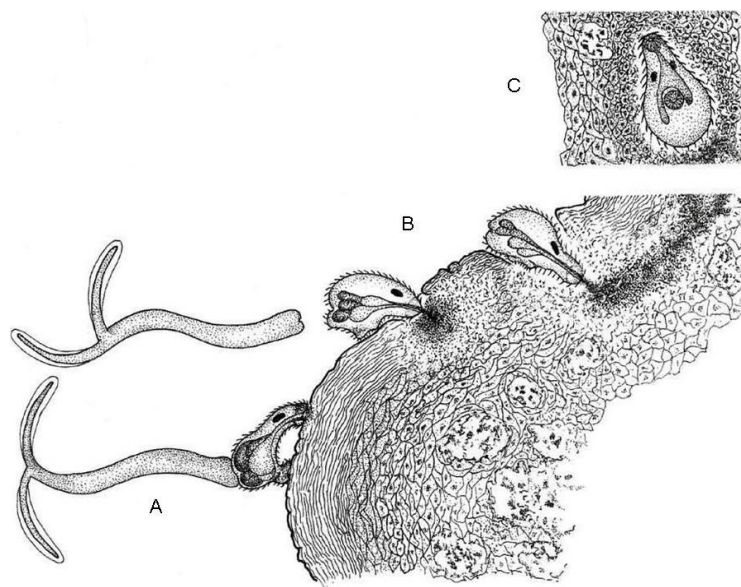
2.1.2 Ontogeneze schistosom se zaměřením na proces penetrace a transformace cercárie na schistosomulum

2.1.2.1 Penetrace cercárie do definitivního hostitele

Cerkárie schistosom jsou uvolňované z meziphostitelských plžů do vodního prostředí ve vysokých počtech. Jejich uvolnění je u trichobilharzií závislé na denním světle. Ve vodním prostředí vyhledávají svého definitivního hostitele. Po jeho nalezení do něj cercárie aktivně pronikají a transformují se na schistosomula.

Vyhledávání definitivního hostitele cercáriemi *T. regenti* a *T. szidati* je založeno na pozitivní fototaktické a geonegativní orientaci (Haas 2001). V průběhu tohoto procesu cercárie vykazují 2 různé fáze chování: aktivní a pasivní fázi. Pasivní fáze je reprezentována klidovou pozicí, kdy je cercárie přichycena acetabulem k hladině vodní plochy. Druhou částí této fáze je klesání cercárie směrem ke dnu, kdy používají ocásek jako kotvu. Aktivní fáze je vyvolána po zastínění cercárií nebo po setkání s mechanickým stimulem. Cercárie plavou vpřed (tělem napřed), směrem od zdroje světla. Plavání zpět s ocáskem napřed je stimulováno po setkání s nevhodným hostitelem (Feiler a Haas 1988a, Horák a kol. 1998a, 2002).

Mezi podněty k přichycení na hostitele patří u cercárií ptačích schistosom fyzikální a chemické stimuly vysílané teplokrevnými obratlovci. U cercárií *T. ocellata* se zejména jedná o teplotu povrchu těla hostitele a povrchové lipidy – ceramidy a cholesterol (Feiler a Haas 1988a, 1988b). Po setkání s těmito stimuly se cercárie přichytí na povrch hostitele pomocí acetabula a začne se plazit po povrchu kůže (viz obr. 1), aby našla vhodné místo k penetraci (záhyb v kůži nebo vyústění vlasového folikulu). Ne všechny cercárie zahájí penetraci po přichycení na hostitele (Hrádková a Horák 2002). Penetrace je výsledkem spolupráce sekrečních a svalových procesů pod kontrolou nervového systému. Je stimulována volnými mastnými kyselinami, zejména nenasycenými kyselinami, ale také nasycenými kyselinami s 9 – 14 uhlíkovými atomy. Větší přítomnost těchto mastných kyselin v lidské kůži koreluje s vyšším stupněm penetrace cercárií do lidí než do specifického hostitele – ptáka (Feiler a Haas 1988a, Haas a van de Roemer 1998, Horák a kol. 2002). Při samotném procesu penetrace se cercárie nejprve přichytí pomocí hlavového orgánu k epidermis, poté zpravidla odhazuje ocásek a vyprazdňuje obsah penetračních žláz. Penetrační žlázy obsahují látky narušující povrch těla hostitele a usnadňují tak cercárii vstup do hostitele a následnou migraci v něm (o obsahu penetračních žláz a jejich funkci více v kapitole 2.2.1). Penetrace je navíc doprovázena penetračními pohyby cercárie, stahováním a natahováním těla. Celý proces od přichycení až po migraci je vyobrazen na obr. 1.



Obr. 1: Penetrace cercárie do definitivního hostitele. **A:** Rozpoznání hostitele a přichycení cercárie na jeho povrch. **B:** Odhození ocásku, uvolnění obsahu penetračních žláz, penetrace cercárie do hostitele. **C:** Následná migrace schistosomula tělem hostitele (převzato a upraveno z Horák a kol. 2002).

2.1.2.2 Transformace cercárie na schistosomulum se zaměřením na změny ve stavbě povrchu těla

Penetrace do definitivního hostitele indukuje transformaci cercárie na schistosomulum. Mezi možné stimuly transformace patří změna salinity nebo změna teploty v průběhu kontaktu s hostitelem a penetrace (Samuelson a Stein 1989, Wiest a kol. 1989, Skelly a Shoemaker 2000). Proces transformace cercárií na schistosomula je u ptačích schistosom velmi podobný jako u lidských schistosom (Horák a kol. 1998b).

Procesy penetrace, transformace a migrace jsou u ptačích schistosom podstatně rychlejší nežli u schistosom lidských. Z tohoto důvodu mohou ptačí schistosomy uniknout rozpoznání imunitním systémem hostitele ve výrazně kratší době než např. *S. mansoni*. Pravděpodobně tak schistosomula ptačích schistosom využívají jiné mechanismy imunitního úniku (Haas a Pietsch 1991, Haas a van de Roemer 1998, Hrádková a Horák 2002).

Transformace zahrnuje změny na ultrastrukturální, fyziologické i biochemické úrovni. Dochází ke změnám nejenom v metabolismu, ale také v morfologii a stavbě povrchu cercárie (Hockley a McLaren 1973). Změny, které se stanou v průběhu transformace, umožňují přežití parazita v těle definitivního hostitele. Transformací schistosoma ztrácí schopnost přežívat ve vodním prostředí, protože postupně odvrhne svůj ochranný povrchový obal, glykokalyx. Z tohoto důvodu dochází i ke změnám v antigenních vlastnostech parazita. Odvržení glykokalyxu je jednou z cest, jak uniknout rozpoznání imunitním systémem hostitele (Horák a kol. 1998b). Odvržení glykokalyxu může být demonstrováno na povrchu parazita změnou vazby fluorescenčně značených lektinů u cercárií a již transformovaných schistosomul (Horák 1995, Horák a kol. 1998b, Blažová a Horák 2005).

Další významnou změnou povrchu schistosom je tvorba dvojité (sedmivrstevné) vnější cytoplazmatické membrány tegumentu, kterou mají jen schistosomula a dospělci. Na tvorbě této membrány se pravděpodobně podílí inkluzní tělíska a membránovité váčky, které jsou přítomné v bezjaderné vrstvě cytoplazmy tegumentu a migrují ze subtegumentálních buněk cytoplazmatickými spoji do syncytia, kde se spojují s vnější membránou (Hockley a McLaren 1973, Cousin a kol. 1981, Dorsey a kol. 2002). Wiest a kol. (1988) se domnívají, že prekursori dvojité membrány jsou přítomni v cercáriích již před spuštěním transformace. Během transformace jsou tyto prekursori ve formě váčků transportovány k povrchu pomocí systému mikrotubulů. Tento proces je analogií exocytózy charakteristické pro sekreční buňky. Dvojitá membrána tegumentu je zpravidla vytvořena během tří až šesti hodin po penetraci. Po této době se nadále membránovité váčky v tegumentu vyskytují, ale mají menší velikost. Pravděpodobně jsou vkládány do vnější membrány během růstu schistosomula (Hockley a

McLaren 1973, Sobhon a Upatham 1990).

Ve stejném momentě, kdy dochází k tvorbě dvojité vnější membrány, původní třívrstevná membrána tegumentu je odvrhována pomocí mikrokloků. Ty vznikají přeformováním třívrstevné membrány cercárií a následně jsou z povrchu odvrženy (Hockley a McLaren 1973).

Dvojitá sedmivrstevná vnější cytoplazmatická membrána tegumentu se vyskytuje u motolic parazitujících v krevním řečišti (Spirorchiidae, Sanguinicolidae a Schistosomatidae). Poskytuje jim ochranu před imunitním systémem hostitele (McLaren a Hockley 1977, Horák a kol. 1998b). Tato membrána je obměňována i v průběhu života dospělých schistosom, jak naznačuje přítomnost membránovitých váčků. Obměny membrány je využíváno např. k odvrhování navázaných protilátek (Hockley a McLaren 1973, Wilson a Barnes 1977, Modha a kol. 1998).

2.2 Žlázy u cercárií schistosom

2.2.1 Acetabulární (penetrační) žlázy

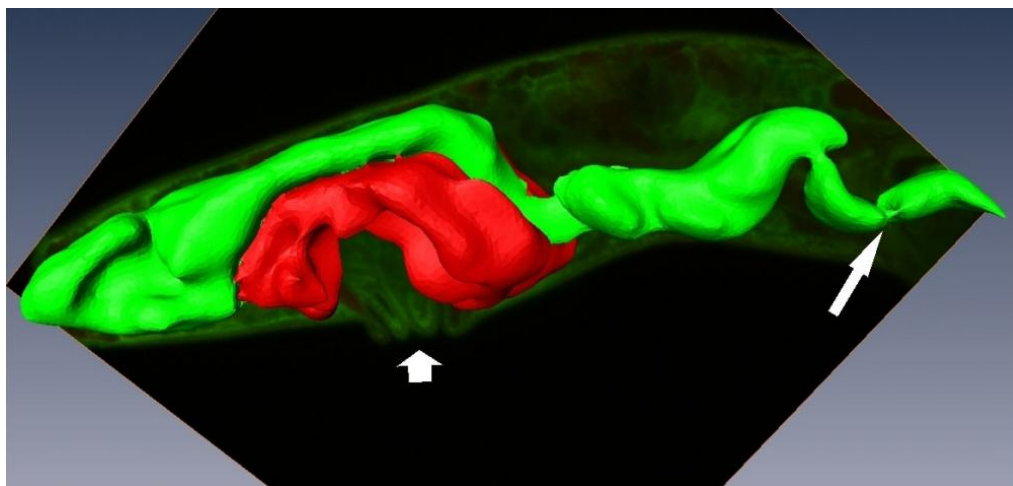
U cercárií schistosom se vyskytují 4 typy žláz: subtegumentální, cirkumacetabulární, postacetabulární a hlavová žláza. Detailněji se zde budeme zabývat posledními třemi typy. Dohromady tyto tři typy žláz zaujímají přibližně jednu třetinu objemu těla cercárie *T. regenti* (postacetabulární žlázy 15%, cirkumacetabulární 12% a hlavová žláza 6%). Cirkumacetabulární a postacetabulární žlázy tvoří dohromady 5 párů penetračních neboli acetabulárních žláz (viz obr. 2). Dělení na tyto dvě skupiny probíhá na základě odlišného složení obsahu, ultrastruktury a pozici k ventrální přísavce (acetabulu). Acetabulární žlázy obsahují látky umožňující přichycení a narušení povrchu těla hostitele a následnou migraci tělem definitivního hostitele (Stirewalt a Kruidenier 1961, Dorsey a kol. 2002, Horák a kol. 2002, Ligasová a kol. 2011).

Acetabulární žlázy jsou tvořeny velkými jednojadernými buňkami. Každá žláza se skládá z rozšířené oblasti (fundus) a dlouhého mikrotubuly lemovaného vývodu, který vyúsťuje skrze tegument na povrch hlavového orgánu cercárie. Celá žláza je vyplněna sekrečními měchýřky, které jsou tvořeny v průběhu vývoje cercárie uvnitř sporocysty. Významná je zde role mikrotubulů, které podporují vývody penetračních žláz a zároveň pomáhají s přesunem sekrečních granulí ze spodní části žlázy do vývodů. Zde granula setrvávají až do procesu penetrace, kdy jsou uvolněna (Dorsey 1975, Dorsey a kol. 2002).

Vývody penetračních žláz jsou obklopeny bohatou muskulaturou, která se pravděpodobně účastní vypuzování sekretů z vývodů nebo tento postup reguluje (Collins a kol. 2011). Penetrační žlázy u cercárií *T. regenti* jsou svou ultrastrukturou a stavbou velmi podobné žlázám cercárií *S. mansoni*. Obdobné je to také v případě vzhledu sekrečních váčků. Výraznější rozdíl je ve velikosti těchto váčků, důvodem patrně bude rozdíl ve velikosti cercárií těchto druhů. Cercárie *T. regenti* jsou větší než cercárie *S. mansoni*, a proto také mají větší sekreční granula. Ani odlišné chemické složení žláz u ptačích a lidských schistosom neovlivňuje ultrastrukturální vlastnosti sekrečních granulí (Horák a kol. 1998a, Dorsey a kol. 2002, Ligasová a kol. 2011).

Penetrační žlázy se vyprazdňují po setkání cercárie se stimuly, které získala při kontaktu s hostitelem. Mezi specifické stimuly, které účinně zprostředkovávají vyprazdňování penetračních žláz u ptačích schistosom, patří nenasyčené mastné kyseliny, např. kyselina linolová a kyselina linoleová, které jsou přítomné v kůži definitivního hostitele (Haas a van de Roemer 1998, Mikeš a kol. 2005). Podobné výsledky byly získány při experimentech s cercáriemi lidských schistosom – *Schistosoma haematobium* a *S. mansoni* (Shiff a kol. 1972). Některé sloučeniny jsou schopné vyvolat vyprazdňování penetračních žláz *in vitro* a to jak u ptačích, tak i u lidských schistosom. Kromě přirozených stimulantů se jedná například o praziquantel či lektiny (Coles a kol. 1988, Matsumura a kol. 1990, Mikeš a kol. 2005). Sekrece způsobená těmito sloučeninami bývá obvykle rychlejší v porovnání s přirozenými stimulanty a některé charakteristické prvky penetrace mohou chybět, např. odhození ocásku (Matsumura a kol. 1990). Tyto netradiční stimulanty způsobují poškození povrchu cercárie nebo narkotizaci těchto larválních stádií (Haas a kol. 1997). Obsah penetračních žláz je vyčerpán během 1 – 2 hodiny od začátku penetrace a penetrační žlázy i s vývody mizí do 40 hodin po začátku penetrace (Cousin a kol. 1981, Crabtree a Wilson 1985).

Sekrety penetračních žláz jsou tvořeny rozpustnou a nerozpustnou částí, jak ukazuje Mikeš a kol. (2005). Tyto sekrety byly studovány pomocí biochemických (Salter a kol. 2000) a proteomických metod (Curwen a kol. 2004, Knudsen a kol. 2005, Curwen a kol. 2006, Jang-Lee a kol. 2007, Dvořák a kol. 2008). Curwen a kol. (2006) prokázali přítomnost metaloproteinázy a imunomodulátorů v acetabulárních žlázách cercárií *S. mansoni*. Dále byly např. charakterizovány vápník vázající proteiny, rozpustné glykolytické proteiny a také glykoproteiny s O- a N-glykosylací (Knudsen a kol. 2005, Jang-Lee a kol. 2007). Obsah jednotlivých penetračních žláz viz dále kapitoly 2.2.1.1 a 2.2.1.2.



Obr. 2: Třírozměrný model acetabulárních žláz cercárie *T. regenti*, postacetabulární žlázy jsou zeleně, cirkumacetabulární žlázy červeně, široká šipka ukazuje acetabulum, úzká šipka směřuje na zaškrcení vývodů postacetabulárních žláz vstupujících do svalového vaku hlavového orgánu (převzato z Ligasová a kol. 2011).

2.2.1.1 Cirkumacetabulární žlázy

Cirkumacetabulární žlázy jsou tvořeny 2 páry buněk, které jsou umístěny okolo acetabula. Fundus těchto žlázových buněk je plný velkých sekrečních granulí. Tato granula se vyskytují ve 2 formách. Jedním typem jsou početné elektronlucidní váčky, které jsou zanořené v homogenním materiálu. Druhým typem jsou elektrondenzní váčky lokalizované blízko orálního tegumentu (Dorsey a kol. 2002). Tento typ žláz a jeho obsah je u ptačích i lidských schistosom charakteristický svou snadnou barvitelností pomocí histologického barviva – alizarinu (Stirewalt a Kruidenier 1961, Mikeš a kol. 2005, Ligasová a kol. 2011).

Obsah cirkumacetabulárních žláz se liší v závislosti na druhu schistosomy, u které byl studován. U lidských parazitů *Schistosoma mansoni* a *S. haematobium* cirkumacetabulární žlázy obsahují serinové proteázy, např. cercariální elastázu (SmCE, ShCE), která se podílí na penetraci tím, že degraduje některé složky kůže a pojivové tkáně (např. keratin, kolagen, elastin). Dále byla prokázána degradace faktorů komplementu, imunoglobulinů hostitele a proteinů na povrchu cercárií v průběhu odvrhování glykokalyxu (McKerrow a kol. 1985, Marikovsky a kol. 1988a, Fishelson a kol. 1992, Salter a kol. 2000, 2002). Na základě biochemických, molekulárních a imunologických studií nebyly serinové proteázy identifikovány u ptačích schistosom (Mikeš a kol. 2005, Kašný a kol. 2007). Původně Dolečková a kol. (2007) našli serinové proteázy u cercárií *T. regenti*, ale záhy se ukázalo, že se jednalo o kontaminace z tkání meziphostitelských plžů. Dvořák a kol. (2008) neprokázali

přítomnost serinových proteáz u cercárií *S. japonicum*, nicméně při studiu genomu byl také u tohoto druhu nalezen gen pro cercariální elastázu (SjCE). Nejedná se ale o izoformy SmCE-1a a SmCE-1b, které reprezentují u *S. mansoni* 90% enzymové aktivity. U *S. japonicum* byl nalezen ortholog izoformy SmCE-2b, která má jen minoritní podíl v aktivitě této elastázy a dosud byl detekován u *S. mansoni* pouze na úrovni mRNA transkriptu (Salter a kol. 2002, Liu a kol. 2009). Liu a kol. (2009) detekovali pomocí anti-rekombinantní SjCE protilátky přítomnost SjCE v kůži infikovaných myší, proto předpokládají sekreci této proteázy během penetrace cercárie do hostitele. Avšak jiní autoři se domnívají, že tato izoforma se nebude podílet na penetraci cercárií do hostitele (McKerrow, ústní sdělení).

U cercárií ptačích schistosom byla prokázána přítomnost velkého množství vápníku, který je zde přítomen i u cercárií lidských schistosom. Vápník se pravděpodobně podílí na regulaci aktivity proteáz uvnitř penetračních žláz, ale jeho pravá funkce nebyla dosud objasněna (Dresden a Edlin 1975, Modha a kol. 1998, Mikeš a kol. 2005).

2.2.1.2 Postacetabulární žlázy

Tři páry postacetabulárních žláz jsou umístěny posteriorně od acetabula. Fundus i vývody těchto žláz jsou vyplněny velkými sekrečními granuly. Granula jsou homogenní ve svém obsahu. Mají protáhlý, oválný tvar, některá jsou nepravidelného tvaru (Dorsey a kol. 2002). Tento typ žláz a jeho obsah je barven lithium karmínem. Postacetabulární i cirkumacetabulární žlázy se barví také apomorfínem, který značí jen žlázy, ale ne jejich sekrety vyloučené mimo tělo cercárií (Stirewalt a Kruidenier 1961, Mikeš a kol. 2005).

Postacetabulární žlázy cercárií *S. mansoni* obsahují mukosubstance, které se podílejí na adhezi cercárií k povrchu hostitele (Stirewalt a Walter 1973). V postacetabulárních žlázách *T. szidati* se vyskytují lektiny se specifitou ke glykosaminoglykanům, β -1,3-glukanům a laktulóze. Jejich funkce není dosud známá, ale pravděpodobně se účastní rozpoznávání hostitelských tkání (Horák a kol. 1997).

I v postacetabulárních žlázách cercárií se vyskytují proteázy, které se pravděpodobně podílejí na degradaci kožních komponent během penetrace (Fishelson a kol. 1992). Postacetabulární žlázy ptačí schistosomy *T. regenti* obsahují cysteinovou peptidázu, katepsin B2, která se podílí na degradaci tkání hostitele, např. štěpí keratin, kolagen, elastin a myelin basic protein. Je považována za možnou náhradu serinových proteáz u ptačích schistosom (Mikeš a kol. 2005, Kašný a kol. 2007, Dolečková a kol. 2009). I u lidských schistosom byla prokázána přítomnost cysteinových peptidáz. Dalton a kol. (1997) prokázali přítomnost

cysteinových peptidáz (katepsinu B a L) u cercárií *S. mansoni* na základě imunolokalizačních studií. Tyto výsledky nebyly podpořeny pozdějšími studiemi (např. Curwen a kol. 2006). U cercárií *S. japonicum* byla prokázána přítomnost cysteinové peptidázy typu katepsinu B (Dvořák a kol. 2008).

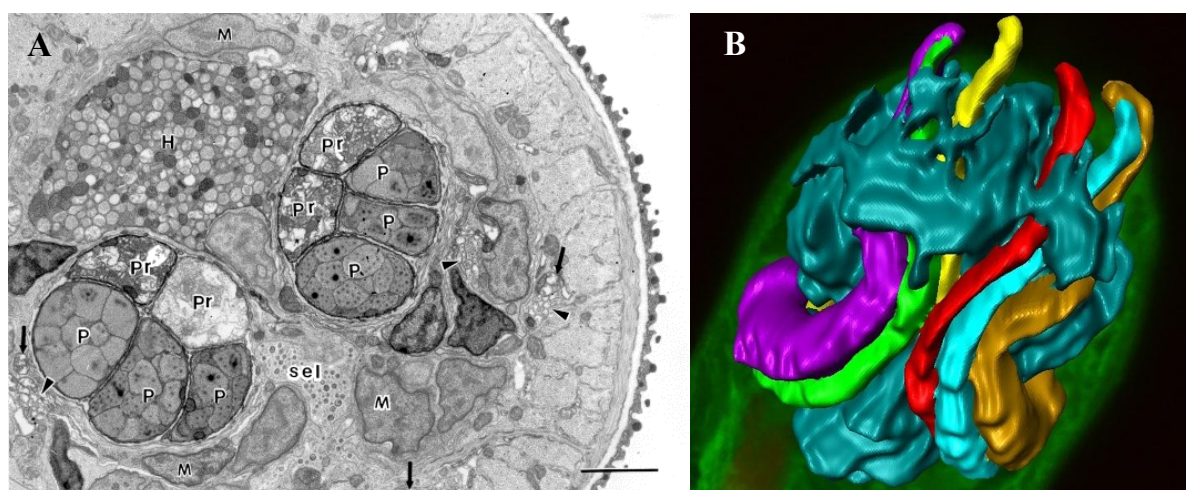
2.2.2 Hlavová žláza

Hlavová žláza je třetím typem žláz u cercárií, kterým se zde budeme zabývat. Nachází se uvnitř anteriorního (hlavového) orgánu tělního segmentu cercárií a je umístěna mezi vývody penetračních žláz (viz obr. 3). Hlavová žláza cercárií *T. regenti* se celá nachází uvnitř svalového vaku hlavového orgánu (Ligasová a kol. 2011). Její spodní část přiléhá ke svalům, které vymezují posteriorní část anteriorního orgánu. Cytoplazma hlavové žlázy je vyplněna velkým počtem sekrečních granulí. Sekreční granula mají více méně oválný tvar, jsou vyplněna homogenní granulární hmotou, která je elektrondenzní. Prostor mezi jednotlivými granuly je vyplněn granulární matrix. Fundus hlavové žlázy je rozdělen do dvou velkých ductů, které se sužují do krátkých vývodů lemovaných mikrotubuly. Jsou napojeny na tegument anteriorního orgánu. V době, kdy cercárie opouští meziphostitelské plže, jsou otvory vývodů hlavové žlázy úzké. K postupnému rozšiřování dochází u cercárií, které penetrují do definitivního hostitele a začínají se transformovat na schistosomula. V této době jsou dukty plné sekrečních granul a dochází k redukci spodní části této žlázy (Dorsey 1976, Dorsey a kol. 2002, Ligasová a kol. 2011).

Dodnes panují nejasnosti ohledně morfologie hlavové žlázy. Dorsey a kol. (2002) uvádějí, že u motolice *Schistosoma mansoni* se jedná o nepárovou jednobuněčnou žlázu s jedním jádrem. Obdobně je tomu u *T. regenti*, jak dokumentuje Ligasová a kol. (2011). Přesný počet vývodů hlavové žlázy do tegumentu je dosud nejasný, určitě jsou přítomny 2 velké výběžky. Pravděpodobně jsou přítomny i menší vývody ve větším počtu, jak naznačuje Dorsey (1976).

Funkce hlavové žlázy nebyla do dnešní doby zcela vysvětlena a potvrzena. Její barvitelnost luxolovou modří a kyselým hematinem ukazuje na přítomnost fosfolipidů v této žláze (Dorsey 1976). Předpokladem je, že se její sekreční granula účastní oprav membrán tegumentu v přední části těla a podílejí se na tvorbě dvojité vnější cytoplazmatické membrány tegumentu transformující se larvy. Podobná funkce byla spatřena u subtegumentálních buněk typu I, které plní tuto funkci pro zbytek tělní části cercárie (Dorsey 1976, Dorsey a kol. 2002). Jiní autoři se domnívají, že obsahuje molekuly s hydrolytickou aktivitou, které se účastní

penetrace a migrace uvnitř těla definitivního hostitele. Předpokládají uvolnění sekrečních granul této žlázy v průběhu migrace schistosomul skrze bazální membránu a stěnu krevní kapiláry (Crabtree a Wilson 1985, Curwen a Wilson 2003). Dorsey (1976) naznačuje, že hlavová žláza se vyprázdní během jedné hodiny po penetraci. Práce jiných autorů demonstruje přítomnost hlavové žlázy u třídních i starších schistosomul (Crabtree a Wilson 1985, Curwen a Wilson 2003).



Obr. 3: Hlavová žláza cercárií schistosom. **A:** Příčný průřez ventrální oblastí anteriorního orgánu *S. mansoni*. **H** hlavová žláza, **M** jádra svalových buněk, **P** vývody postacetabulárních žláz, **PR** vývody cirkumacetabulárních žláz, **sel** cytoplazmatický výběžek subtegumentální buňky s inkluzními tělísky, **šipka** svazky nervových vláken. Měřítka je 0,1 μ m (převzato z Dorsey a kol. 2002). **B:** Třírozměrný model hlavové žlázy cercárie *T. regenti* (tmavě modře) se třemi páry vývodů acetabulárních žláz probíhajícími skrze hlavovou žlázu (každý vývod je znázorněn jinou barvou) (převzato z Ligasová a kol. 2011).

2.3 Glykokalyx cercárií schistosom

Tomuto tématu byla věnována velká část mé bakalářské práce. Pro pochopení experimentální části této práce je potřeba zde uvést několik základních informací, které jsou přehledně shrnuty v této kapitole. Detailnější informace jsou k nalezení ve výše jmenované bakalářské práci (Chaloupecká 2010).

2.3.1 Ultrastruktura a molekulární složení glykokalyxu

Glykokalyx se vyskytuje na povrchu třívrstvé membrány tegumentu cercárií. Je integrální součástí této povrchové membrány a je produkován samotným tegumentem (Kemp 1970, Morris 1971, Hockley a McLaren 1973, Stein a Lumsden 1973, Horák a kol. 1998b). Glykokalyx je syntetizován v Golgiho komplexech subtegumentálních buněk cercárií, na povrch cercárie je translokován elektron-denzními váčky (Stein a Lumsden 1973). Pravděpodobně vzniká polymerizací jednoduchých podjednotek (Caulfield a kol. 1988).

U cercárií *Schistosoma japonicum* se síla vrstvy glykokalyxu pohybuje mezi 0,5 – 0,9 μm , u cercárií *S. mansoni* mezi 1 – 2 μm . Na ocásku je tato vrstva výrazně tenčí než na povrchu těla cercárie. Glykokalyx *S. mansoni* je svou ultrastrukturou velmi podobný jako u cercárií *S. japonicum* a *S. mekongi* (Samuelson a Caulfield 1985, Sobhon a Upatham 1990). Na základě studií transmisní (TEM) a skenovací (SEM) elektronovou mikroskopií se ukazuje, že glykokalyx je hustá síť tvořená větvenými a navzájem propojenými fibrilami a částicemi. Tyto fibrily jsou tvořeny polymerizováním výše zmíněných částic (Samuelson a Caulfield 1985, Caulfield a kol. 1987, Sobhon a Upatham 1990). Glykokalyx pokrývá povrch cercárie včetně tegumentálních trnů. Není přítomen na vývodech penetračních žláz a u ústí senzorických papil (Robson a Erasmus 1970 cit. dle Hockley 1973, Morris 1971).

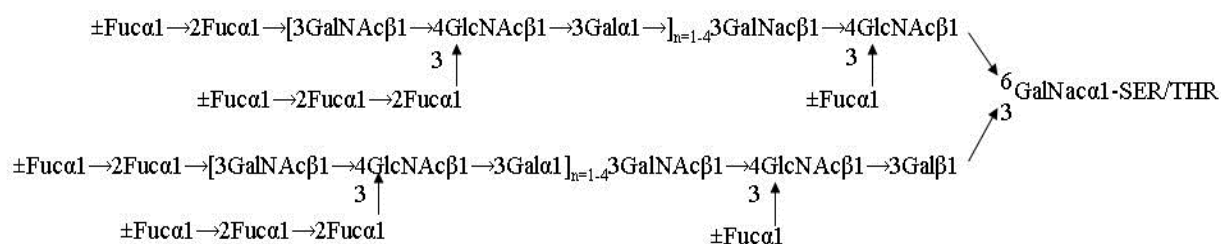
Glykokalyx je pro cercárie nepostradatelná struktura, která plní řadu funkcí, bez kterých by cercárie nepřežily. Jednou z nejdůležitějších vlastností je, že cercáriím poskytuje ochranu před nepříznivými podmínkami vodního prostředí, které má nízkou osmotickou hodnotou v porovnání s tělem cercárie (Morris 1971, Sobhon a Upatham 1990). Dalšími důležitými funkcemi jsou ochrana cercárie před jejich vlastními enzymatickými sekrety a enzymy z trávicích žláz plžů, účast na kontrole permeability povrchové membrány cercárie apod. (Morris 1971, Hockley 1973, Stein a Lumsden 1973).

Charakterizace molekulárního složení glykokalyxu odhaluje, o jak komplexní strukturu se jedná. Glykokalyx je struktura bohatá na sacharidy, které jsou vázány na lipidy nebo proteiny membrány tegumentu. Hlavní složku glykokalyxu schistosom (např. *Schistosoma mansoni*, *Trichobilharzia szidati*, *T. regenti*) tvoří bohatě fukosylované glykany, které se nevyskytují v glykokalyxu u jiných skupin motolic (Horák a Mikeš 1995, Khoo a kol. 1995, Podhorský a kol. 2009). Köster a Strand (1994) ukázali, že tyto fukosylované epitopy se vyskytují na povrchu cercárií a nově transformovaných schistosomul, ale nejsou exprimovány na povrchu dospělců schistosom. Z dalších sacharidů se v glykokalyxu cercárií schistosom vyskytuje galaktosa, glukosa, N-acetyl-glukosamin, N-acetyl-galaktosamin a manosa

(Caulfield a kol. 1987, Nanduri a kol. 1991, Xu a kol. 1994). U cercárií *S. mansoni*, *T. regenti* i *T. szidati* byl pozorován fenomén odlišné glykosylace povrchu ocásku a těla. Glykokalyx tělní části obsahuje hodně fukosy, která se nevyskytuje na ocásku, naopak glykokalyx této oblasti je bohatý na glukosu (Nanduri a kol. 1991, Horák 1995, Horák a kol. 1998b, Podhorský a kol. 2009).

Bližší charakterizace sacharidového složení glykokalyxu byla provedena u cercárií lidských schistosom, zejména na druhu *Schistosoma mansoni*. Glykany glykokalyxu jsou nejčastěji připojené přes N-acetyl-galaktosamin k serinu nebo threoninu proteinů (O-glykosylace). Podrobnější strukturální studie ukázala na přítomnost velmi různorodé skupiny vysoce fukosylovaných O-glykanů. Jejich velikost se pohybuje od 12 do více než 60 sacharidových reziduí. Mají neobvyklou opakující se trisacharidovou strukturu $[\rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow]_n$, která tvoří oporu oligosacharidu (viz obr. 4). Tri- až penta- fukosylované epitopy se vážou na interní GlcNAc a terminální GalNAc. Jedinečnost O-glykanů glykokalyxu spočívá v opakování disacharidu LacdiNAc (N,N'-diacetyl laktosamin, $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$), které jsou oddělené Gal, netvoří tedy poly-LacdiNAc (Khoo a kol. 1995).

Dalšími běžnými glykany u cercárií *S. mansoni* a *S. japonicum* jsou N-glykany, u kterých jsou sacharidy připojeny k amidovému dusíku L-asparaginu proteinu. Většina těchto N-glykanů a některé O-glykany mají přítomný Lewis X antigen na terminální pozici (o této struktuře blíže v kapitole 2.3.1.1) (Khoo a kol. 1995, Huang a kol. 2001, Khoo a kol. 2001). Dále byly z povrchových struktur cercárií *Schistosoma mansoni* izolovány vysoce antigenní glykolipidy. I na těchto strukturách byl přítomen Lewis X antigen (Weiss a kol. 1986, Wuhler a kol. 2000).



Obr. 4: O-glykany z glykokalyxu cercárií *S. mansoni* (Khoo a kol. 1995).

2.3.1.1 Lewis X antigen

Lewis X antigen (Le^x , CD15, 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamin) známý též jako stádiově specifický embryonální antigen SSEA-I (stage specific embryonic antigen-I) je trisacharid se strukturou $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3) \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ (viz obr. 5, Gooi a kol. 1981, Hakomori a kol. 1981). Je exprimovaný na glykoproteinech, glykolipidech a proteoglykanech různých lidských buněk. Jeho výskyt je třikrát častější na glykoproteinech než na glykolipidech (Fox a kol. 1983, Spooncer a kol. 1984). Vyskytuje se například na glykokonjugátech polymorfonukleárních granulocytů (Spooncer a kol. 1984) a různých nádorů, jako je například karcinom tlustého střeva (Hittlet a kol. 2003) a akutní promyelocytická leukémie (Rizzatti a kol. 2004). Lewis X hraje důležitou roli v embryogenezi, buněčné signalizaci, vývoji nervové soustavy, buněčném rozpoznávání během fertilizace a slouží jako adhezivní molekula (Fox a kol. 1983, Johnston a kol. 1998, Allendoerfer a kol. 1999, D'Costa a Petitte 1999, Geijtenbeek a kol. 2004).

Častěji se na povrchu lidských buněk vyskytuje sialylovaný Lewis X antigen (CD15s, sLe^x). Je to tetrasacharid, který je běžně přítomen na glykolipidech leukocytů. Je znám svou rolí v zánětlivých procesech a v buněčném rozpoznávání zejména v procesu fertilizace. Vyskytuje se na povrchu oocyty a napomáhá spermií v rozpoznání vajíčka (Pang a kol. 2011).

Lewis X i sialylovaný Lewis X antigen se vyskytují nejen u savců, ale také u ptáků. Le^x je např. exprimován v průběhu vývoje B buněk a během raného vývoje ptačích embryí (Lee a kol. 1996, D'Costa a Petitte 1999). sLe^x byl detekován na povrchu vyvíjejících se B a T lymfocytů (Varki a kol. 1999).

Le^x antigen je také exprimován lidskými schistosomami. Dosud byl identifikován u *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* i *S. haematobium*. U ostatních motolic a hlístic nebyla jeho přítomnost prokázána. sLe^x nebyl do dnešní doby detekován u parazitických helmintů (Nyame a kol. 1998). Lokalizace Lewis X antigenu probíhala různými způsoby (Western blot, ELISA, imunocytochemie, imunohistochemie apod.) a za použití protilátek zakoupených od různých firem. Z těchto důvodů plynou rozdíly ve výsledcích některých studií.

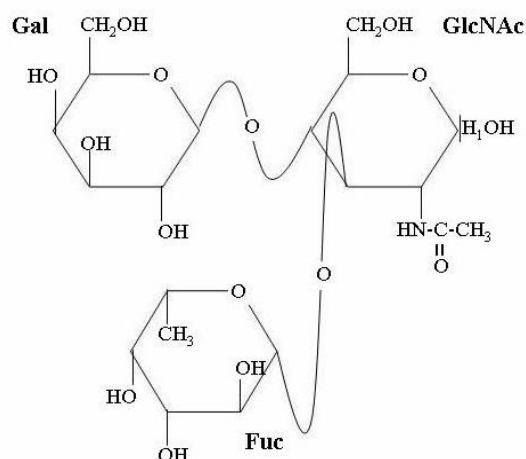
Exprese Le^x antigenu je u *Schistosoma mansoni* vývojově regulovaná, jeho výskyt byl sledován napříč celým životním cyklem. Tento antigen byl detekován na tegumentu cercárií, schistosomul a dospělců (Ko a kol. 1990, Köster a Strand 1994, van Remoortere a kol. 2000, Nyame a kol. 2003). Dále byl Le^x antigen lokalizován ve střevě dospělců *S. mansoni* a na glykoproteinech vajíček (Köster a Strand 1994, van Remoortere a kol. 2000).

Jeho přítomnost na povrchu cercárií je diskutabilní a liší se mezi výsledky

jednotlivých studií. Köster a Strand (1994) nedetekovali Lewis X antigen na povrchu cercárií, stejně tak i autoři van Remoortere a kol. (2000). V těchto studiích prokázali přítomnost tohoto antigenu pouze na sekretech blízko vývodů penetračních žláz a u acetabula cercárií.

Le^x antigen bývá přítomen na glykokonjugátech v monomerní a polymerní formě. Z tohoto důvodu patrně plyne i odlišná vazba komerčních protilátek na povrch cercárií, u kterých se Le^x antigen vyskytuje pouze v polymerní formě, a proto možná není rozpoznáván monoklonálními protilátkami proti monomerní formě Le^x antigenu. Monomerní forma Le^x antigenu je exprimována po transformaci cercárií na schistosomula a také na apikální části hlavového orgánu cercárií (van Remoortere a kol. 2000).

Le^x antigen je epitop, který je sdílen mezi *S. mansoni* a jejím hostitelem (Ko a kol. 1990). Schistosomy ho zřejmě využívají jako mimikry a pravděpodobně jim pomáhá unikat imunitnímu systému hostitele (Wuhrer a kol. 2000).



Obr. 5: Chemická struktura Le^x antigenu.

2.3.2 Mechanismus odvrhování glykokalyxu cercárií při transformaci na schistosomula

Glykokalyx je silně antigenní struktura, která přitahuje pozornost imunitního systému hostitele, a proto jej cercárie během penetrace do definitivního hostitele odvrhují. Tato struktura u cercárií ptačích i lidských schistosom je rozpoznávána protilátkami z lidí i laboratorně infikovaných hlodavců se *Schistosoma mansoni*, *Trichobilharzia szidati* a *T. regenti* (Kemp 1970, Kouřilová a Kolářová 2002, Chanová a kol. 2012). Aktivuje alternativní dráhu komplementu a navozuje humorální odpověď hostitele (Samuelson a Caulfield 1986, Hussein a kol. 1997). Odvržení glykokalyxu umožňuje schistosomě, aby se vyhnula protilátkovému a komplementem zprostředkovanému ničení imunitním systémem hostitele (Hockley a McLaren 1973, Horák a kol. 1998b). Během transformace cercárií na

schistosomula tak dochází k vymizení protilátkových, ale také lektinových ligandů z povrchu schistosom (Horák a kol. 1998b). Také na povrchu schistosomul se vyskytuje glykokalyx, který je ale jiného sacharidového složení a je výrazně tenčí v porovnání s glykokalyxem u cercárií (Hokke a Yazdanbakhsh 2005).

Třicet minut po penetraci cercárie kůží hostitele je většina povrchu schistosomula stále kryta glykokalyxem, který je z jejího povrchu rychle ztracen. Jeho ultrastruktura se liší od glykokalyxu, který je na povrchu cercárií. V tomto období je přítomna stále většina třívrstevné povrchové membrány tegumentu. Obdobná situace je i u schistosomul 1 hodinu po penetraci, u kterých se začínají objevovat úseky sedmivrstevné membrány. Již 3 hodiny po penetraci je většina povrchu bez cercáriového glykokalyxu, ten se vyskytuje jen v oblastech, kde je stále přítomna třívrstevná povrchová membrána. U *S. japonicum* dochází ke kompletní ztrátě glykokalyxu po 6 hodinách, u *S. mansoni* do 3 hodin po penetraci (Hockley a McLaren 1973, Sobhon a Upatham 1990).

Hockley a McLaren (1973) jako první navrhli, že dlouhé mikroklyky vyskytující se na povrchu transformujících se schistosomul brzy po začátku transformace, jsou vytvářeny z původní třívrstevné membrány a jsou zodpovědné za rychlé a masivní odvrhování této membrány i s glykokalyxem. Tento proces je uskutečňován pomocí dobře koordinovaného mechanismu: glykokalyx a třívrstevná membrána cercárií je odvržena pomocí „bublin“, mikroklyků a membránových shluků vytvářejících se na povrchu schistosom. Mikroklyky se nejprve prodlužují a poté oddělují z povrchu schistosomul (McLaren a Hockley 1976, Samuelson a Caulfield 1985, Sobhon a Upatham 1990). Jiní autoři naznačují, že po inokulaci cercárií do peritoneální dutiny myši, na povrch schistosom adherují neutrofily, které mohou hrát roli během transformace cercárií na schistosomula tím, že se podílejí na odstraňování glykokalyxu fagocytózou (de Melo a kol. 1993).

Odvrhování glykokalyxu je komplexní proces. Další roli může hrát sekretovaný obsah penetračních žláz cercárií. Po setkání s tímto materiálem dochází ke ztenčení vrstvy glykokalyxu na povrchu cercárií (Samuelson a Caulfield 1985). Samuelson a Caulfield (1982) předpokládají, že je většina glykokalyxu odvrhována v neporušené formě. Výsledky jiné studie naznačují, že glykokalyx je odvrhován depolymerizací na malé částice při transformaci cercárie na schistosomulum (Caulfield a kol. 1987). Depolymerizace může být způsobena médiem, ve kterém byla prováděna transformace *in vitro*, protože má větší iontovou sílu než voda. Dalším důvodem může být, že fibrily glykokalyxu jsou fyzicky lámány do malých podjednotek, popř. k depolymerizaci dochází vlivem sekretovaných látek schistosom (Caulfield a kol. 1987).

2.3.3 Molekuly podílející se na odvrhování glykokalyxu

Jak již bylo zmíněno, povrchové molekuly glykokalyxu jsou vázány na lipidy nebo proteiny membrány tegumentu. Z tohoto důvodu se předpokládá, že na odvrhování glykokalyxu by se mohly podílet proteolytické enzymy, popř. fosfolipázy z penetračních žláz cercárií. Teoretická účast fosfatidylinositol-specifické fosfolipázy je založena na přítomnosti GPI (glykosylfosfatidylinositolové) kotvy, která se také účastní kotvení povrchových molekul do tegumentu cercárií (Espinoza a kol. 1988, Marikovsky a kol. 1988a, Pearce a Sher 1989, Sauma a Strand 1990, Fishelson a kol. 1992).

Modha a kol. (1998) předpokládají účast vápníku, který stimuluje odstranění glykokalyxu z povrchu cercárie za pomoci proteáz, které jsou při penetraci uvolněné z penetračních žláz. Účast sekretů penetračních žláz v tomto procesu je podpořena experimenty s detekcí povrchové transformace lektiny a protilátkami proti hemagglutininům cercárií. Výsledky ukazují, že tento proces začíná na předním konci těla cercárie, kde vyúsťují vývody penetračních žláz (Marikovsky a kol. 1988a, 1990, Fishelson a kol. 1992, Horák a kol. 1998b). Dalším faktem, který je v souladu s touto hypotézou, je přítomnost sekretů penetračních žláz okolo schistosomul a ohraničení vstupního tunelu těmito sekrety v průběhu penetrace (Horák a kol. 2002). Odvrhování glykokalyxu u cercárií *S. mansoni* je časově synchronizované se sekrecí serinových proteáz (28 a 60 kDa). Většina proteolytické aktivity je přisuzována 28 kDa proteáze (autoři předpokládají, že by se mohlo jednat o cercariální elastázu), která štípe kasein, želatinu a komplementové proteiny C3 a C3b (Marikovsky a kol. 1988a, 1988b). Autoři navrhuje, že tyto 2 proteázy přispívají k štěpení povrchových molekul transformujících se schistosomul včetně glykokalyxu, a tak urychlují transformaci cercárií na schistosomula (Marikovsky a kol. 1988a). Současně se 28 kDa proteáza podílí na degradaci pojivových tkání a je využívána v průběhu penetrace. Tato serinová proteáza se vyskytuje v obou typech penetračních žláz i v samotném glykokalyxu (Marikovsky a kol. 1990).

2.4 Lektiny

2.4.1 Charakteristika lektinů a jejich využití

Lektiny jsou proteiny nebo glykoproteiny neenzymové a neimunoglobulinové povahy derivované z rostlin, živočichů, mikroorganismů, virů nebo hub. Mají nejméně 2 vazebná místa rozpoznávající sacharidy s různými specifitami (tzv. CRD, carbohydrate recognition domain). Nejčastěji jsou lektiny děleny na základě porovnání primárních sekvencí těchto

domén do 3 hlavních skupin: C-, S- a P-typ (Drickamer 1994, Ni a Tizard 1996). Lektiny jsou schopné specificky rozeznávat a reverzibilně vázat sacharidy s vysokou specifitou. Interakce vznikající mezi vazebným místem lektinu a sacharidem jsou nekovalentní. Značení lektiny představuje citlivý detekční systém pro změny v glykosylaci a expresi sacharidů, které se mohou vyskytovat v průběhu embryogeneze, růstu, životního cyklu apod. (Rhodes a Milton 1998, Sharon a Lis 2007).

Některé lektiny jsou známy svým cytotoxickým efektem na normální i rakovinotvorné buňky. Jedná se o tzv. přímou lektinovou cytotoxicitu, která se projevuje proliferací nebo programovanou smrtí (apoptózou) buněk. Tento fenomén je znám např. u lektinů Con A, WGA, LCA, RCA (Rhodes a Milton 1998). Lektiny se mimo jiné také podílejí na různých biologických procesech, jako je např. aglutinace, buněčná adheze, opsonizace, fagocytóza a migrace buněk (Ni a Tizard 1996).

Lektiny se používají pro specifické značení a identifikaci sacharidového složení tkání obratlovců a bezobratlých. Mohou být značeny různými způsoby. Nejčastěji se používají tři způsoby značení: enzymové (např. křenová peroxidáza), radioizotopové (nejčastěji ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{125}I) a fluorescenční (např. fluorescein-5-izothiokyanát (FITC) a tetramethylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát (TRITC)). Při detekci sacharidových struktur pomocí lektinů se často využívá přímé metody. Ta je založena na detekci lektinové vazby skrze přítomnost značených konjugátů přímo na povrchu sacharidové molekuly (Rhodes a Milton 1998, Sharon a Lis 2007).

Značených derivátů lektinů se často využívá při experimentech s lidskými schistosomami. Lektiny byly studovány jako látky indukující vyprazdňování penetračních žláz u cercárií *S. mansoni* (Coles a kol. 1988) a stimulující *in vitro* transformaci miracidí na sporocysty (Georgieva a kol. 2012). Collins a kol. (2011) studovali prostřednictvím fluorescenčně značených lektinů detailní anatomické struktury cercárií *Schistosoma mansoni*. Lektinů se také využívá při studiu povrchových struktur schistosom. Nejčastěji slouží k vzájemnému druhovému a stadiálnímu porovnání sacharidového složení glykokalyxu motolic. Povrchová glykosylace cercárií schistosom byla dosud popsána u druhů *Schistosoma mansoni* (Linder 1985, Coles a kol. 1988), *S. japonicum* (Beisler a kol. 1984), *Trichobilharzia franki* (Podhorský a kol. 2009), *T. regenti* (Blažová a Horák 2005, Podhorský a kol. 2009), *T. szidati* (Horák 1995, Horák a Mikeš 1995, Horák a kol. 1998b, Podhorský a kol. 2009). Porovnání glykosylace povrchu cercárií 9 druhů motolic pomocí fluorescenčně značených lektinů je shrnuto v mé bakalářské práci (Chaloupecká 2010).

2.4.2 Mannose binding lectin (MBL)

Tato kapitola je zahrnuta s ohledem na předpokládané interakce lektinů imunitního systému hostitele se sacharidovými strukturami na povrchu jednotlivých stádií schistosom. Mannose binding lectin (MBL) neboli manosu vázající lektin patří mezi tzv. kolektiny. Kolektiny selektivně rozeznávají oligomanosidy a jsou součástí vrozené imunity, kde rozpoznávají sacharidové složky exprimované patogeny. Mají klíčovou roli při ochraně organismu před patogeny zejména svou schopností fungovat jako opsoniny (Turner 2003, van de Wetering a kol. 2004).

Lidský MBL je tvořen 3 identickými peptidovými řetězci. Každý řetězec o velikost 32 kDa nese lektinovou doménu (CRD) (Turner 2003). Primárně je produkován v játrech, jaterními buňkami je sekretován do krevního oběhu. Nižší exprese byla také detekována v plicích, brzlíku, ledvinách, tenkém střevě a varlatech (Wagner a kol. 2003). MBL má afinitu k N-acetyl-glukosaminu, manose, N-acetyl-manosaminu, fukose a glukose. Obsáhlejší sacharidová specifita MBL umožňuje interakce s větším spektrem patogenů (Neth a kol. 2000, Turner 2003).

MBL se účastní lektinové dráhy komplementového systému. Tato dráha probíhá podobně jako cesta klasická. Jednotlivé dráhy komplementového systému se od sebe liší aktivací klíčové složky C3. U lektinové dráhy dochází k aktivaci lektinem, který se váže na sacharidové epitopy na povrchu patogenu. MBL přítomný v krevním řečišti tvoří komplex se serinovými proteázami MASPs (MBL-associated serine proteases). Jakmile se MBL naváže na povrch patogenu, dojde k aktivaci serinových proteáz a spuštění kaskády komplementu štěpením a aktivací C4 a C2. Dochází k vytvoření C3 konvertázy, která štěpí C3 na C3a a C3b. Fragmenty C3b se vážou na povrch patogena a spustí kaskádu komplementu. V případě snížené produkce MBL dochází ke vzniku závažných, opakujících se infekcí a zánětů (Turner 2003).

MBL byl také izolován z kuřecího séra pomocí afinitní chromatografie (chMBL). Svou strukturou a velikostí se podobá MBL v lidském séru, pravděpodobně se jedná o jeho homolog (Wang a kol. 1985, Laursen a kol. 1995). Nielsen a kol. (1998) naznačují zvýšenou syntézu chMBL během akutní fáze virové infekce a předpokládají aktivní účast tohoto MBL v imunitním systému ptáků.

MBL je díky své širší sacharidové specifitě schopen se vázat na většinu sacharidů na povrchu cercárií a dospělců *S. mansoni*. Sacharidy na povrchu cercárií a dospělců tak představují vazebné ligandy pro MBL. Dosavadní *in vitro* experimenty naznačují, že komplement by mohl být na tegumentu schistosom aktivován lektinovou cestou (Klabunde a kol. 2000).

3 Materiál a metodika

3.1 Laboratorní modely

V experimentech byla používána stadia motolic *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*, jejichž chov je v naší laboratoři úspěšně udržován již několik let. Experimenty byly zaměřeny na druh *Trichobilharzia regenti*, druh *T. szidati* sloužil k porovnávání výsledků a k optimalizaci metodiky.

Mezihostitelem druhu *T. regenti* v našich laboratorních podmínkách je plž *Radix lagotis*, u druhu *T. szidati* slouží jako mezihostitel plž *Lymnaea stagnalis*. Plži jsou chováni v akváriích při okolní teplotě s provzdušňovanou a filtrovanou vodou obohacenou o CaCO_3 a krmení hlávkovým salátem. Jako definitivní hostitel v životních cyklech obou druhů ptačích schistosom sloužila kachna domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*).

3.2 Roztoky, pufrы a lektiny

Většina chemikálií, které byly používány v následujících experimentech, pochází od firmy Sigma, pokud není uvedeno jinak. Lektiny a hydrolyzát chitinu (viz tab. 1) byly zakoupeny od firmy Vector Laboratories, lektin HPA od firmy Invitrogen. Hydrolyzát chitinu je dodáván jako vysoce koncentrovaná směs N-acetyl-glukosaminu (GlcNAc) a oligo GlcNAc. Hodnotu jeho pH bylo před použitím nutné upravit přidáním 0,75 μl KOH k 0,5 ml hydrolyzátu chitinu.

HEPES pufr: 10 mM HEPES, 1mM CaCl_2 (pH 7,2).

HEPES pufr se 150 mM NaCl: 10 mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 150 mM NaCl (pH 7,2).

0,1 M PBS pufr (fosfátový pufr se 150 mM NaCl): Jedná se o směs 0,2 M Na_2HPO_4 a 0,2 M NaH_2PO_4 .

Tab. 1: Lektiny použité v experimentech, jejich inhibitory a vazebné preference.

Lektiny	Zkratka	Inhibitor	Vazebná preference (terminální sekvence)
Lektiny se specifitou k Fuc			
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	Fuc	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	Fuc	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow > (GlcNAc β 1 \rightarrow 4) $_n$ > GalNAc α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow > GlcNAc β 1 \rightarrow 6Gal > Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc
Lektiny se specifitou k Man a Glc			
<i>Lens culinaris</i>	LCA	MetMan/MetGlc	Man α 1 \rightarrow > Glc α 1 \rightarrow > > GlcNAc; Fuc α 1 \rightarrow 6GlcNAc
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	MetMan/MetGlc	Man α 1 \rightarrow > Glc α 1 \rightarrow > GlcNAc α 1 \rightarrow
<i>Pisum sativum</i>	PSA	MetMan/MetGlc	Man α 1 \rightarrow > Glc α 1 \rightarrow > > GlcNAc; Fuc α 1 \rightarrow 6GlcNAc
Lektiny se specifitou k GlcNAc			
<i>Solanum tuberosum</i>	STA	Hydrolyzát chitinu	větvené i lineární poly-LacNAc, (GlcNAc) $_n$
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	oligo GlcNAc	(GlcNAc β 1 \rightarrow 4) $_n$ > GlcNAc β 1 \rightarrow 4 > NeuNAc
Lektiny se specifitou k Gal nebo GalNAc			
<i>Glycine max</i>	SBA	GalNAc	GalNAc α , β 1 \rightarrow > > Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 > Gal
<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc	GalNAc α 1 \rightarrow > GalNAc > GlcNAc > α -Gal
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	Gal, Lac	Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc > β -Gal > α -Gal > GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSL-I	Gal/GalNAc	α -GalNAc, α -Gal
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Gal	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc > > Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc > Gal = Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc
Lektiny se specifitou k Gal i GalNAc			
<i>Artocarpus integrifolia</i>	JAC	GalNAc, Mel	polyspecifický lektin, Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr, GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

Vysvětlivky: Fuc – L-fukosa, Gal – D-galaktosa, GalNAc – N-acetyl-D-galaktosamin, Glc – D-glukosa, GlcNAc – N-acetyl-D-glukosamin, Lac – α -laktosa, Man – D-manosa, Mel – melibiosa (disacharid Gal α 1 \rightarrow 6Glc), MetMan – α -D-methylmanopyranosid, MetGlc – α -D-methylglukopyranosid (Lachema Brno), NeuNAc – N-acetylneuraminová kyselina, poly-LacNAc – poly-N-acetyllaktosamin, Ser – serin, Thr – threonin.

Zdroj: Horák (1995), Rhodes a Milton (1998), www.vectorlabs.com.

Pufry pro přípravu vzorků na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) – vhodný pro schistosomula (Bulantová, Lípová ústní sdělení):

Pufr 1 (do 10 ml):

0,2 M kakodylátový pufr (6,5 ml)

150 mM NaCl (1,5 ml)

7 mM glukosa (0,5 ml)

2 mM CaCl₂ (0,75 ml)

0,1 M hexakynoželesnatan draselný (K₄[Fe(CN)₆]) – stabilizátor membrán (0,75 ml)

Osmolarita tohoto pufru je 280 mOsm/kg.

Pufr 2 (do 10 ml):

0,2 M kakodylátový pufr (7,5 ml)

150 mM NaCl (1,5 ml)

7 mM glukosa (0,5 ml)

2 mM CaCl₂ (0,5 ml)

Osmolarita tohoto pufru je 275 mOsm/kg.

3.3 Izolace cercárií z vodních plžů

Infikovaní plži v patentní periodě (cca 5 – 6 týdnů po nákaze miracidii) byli umístěni do skleněných kádinek s odstátou vodovodní vodou. Následně byli na 30 – 90 minut exponováni pod umělým světelným zdrojem. Na tento stimul cercárie opouštěly tělo meziphostitelského plže. Pozitivně fototaktické cercárie rodu *Trichobilharzia* byly zahuštěny v odměrné baňce obalené, krom hrdla, hliníkovou fólií. Hrdlo baňky bylo nasvíceno a cercárie migrující za světlem byly sbírány do 50 ml centrifugačních zkumavek se šroubovacím víčkem nebo aplikovány přímo na podložní sklíčka.

3.4 Infekce definitivních hostitelů

K infekci 4 – 7 denních kachňat (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) byly použity cercárie *Trichobilharzia regenti* uvolněné z meziphostitelských plžů. Kachny byly pevně fixovány k nádobě s končetinami ponořenými ve vodě s volně plovoucími cercáriemi a exponovány takto 1 hodinu. Postup infekce byl prováděn podle Meuleman a kol. (1984). Infekční dávka cercárií k nákaze kachen byla určována podle délky nákazy, obvykle 1500 – 1800 jedinců pro

3 – 7 denní nákazy, 2500 – 4000 jedinců pro 1,5 hodinové a 1 denní nákazy a cca 1000 cercárií pro 17 denní nákazy. Úspěšnost penetrace byla kontrolována pozorováním petechií na pokožce končetin v místech penetrace cercárií.

3.5 Sběr schistosomul a dospělců *T. regenti*

Sběr schistosomul byl prováděn dle požadavku na věk schistosomul: 1, 3, 5 a 7 dní po infekci (p.i.) nebo 1,5 hodiny p.i., popř. dříve – viz kapitola 3.12. Sběr dospělců následoval 17 dní po infekci. Kachny byly usmrčeny dekapitací. V případě získávání 3, 5 a 7 denních schistosomul byla kachnám vyjmuta mícha z páteře a vložena do Petriho misky s 10 mM HEPES pufrém pH 7,2 s 1 mM CaCl₂ a 150 mM NaCl nebo s PBS. Při získávání 1,5 hodinových a 1 denních schistosomul byla kachnám odpreparována kůže z končetin a poté také vložena do stejných pufrů jako v případě 3 – 7 denních schistosomul. Kůže byla následně nastříhána a mícha natrhána na malé kousky. Dospělci byli získáváni ze sliznice nosní dutiny kachny, která byla vystřižena a následně ponořena do Petriho misky s PBS. Sběr schistosomul a dospělců byl prováděn pomocí pipety se speciální špičkou („low-retention“) pod binokulární lupou. Takto sesbíraná stádia byla skladována na ledu před použitím v dalších pokusech.

3.6 *In vitro* kultivace schistosomul *T. regenti*

Pro *in vitro* kultivace byla 50 ml centrifugační zkumavka s cercáriemi umístěna na led, tímto způsobem došlo k imobilizaci a koncentrování cercárií u dna. Následně byla z centrifugační zkumavky odsáta přebytečná voda a cercárie byly opakovaně (nejméně 20x) nasáty a vypuštěny injekční stříkačkou s injekční jehlou (s průměrem 0,6 mm). Tento proces indukuje transformaci cercárií na schistosomula. Při posledním kroku tohoto postupu byla larvální stádia umístěna do kultivační misky (malá Petriho miska). Kroužením byla zkoncentrována na střed, tekutina byla opatrně odsáta Pasterovou pipetou s užším koncem a nahrazena kultivačním médiem SCM 169 (kultivační médium pro schistosomy 169, složení média dle Basch 1981) bez BSA (bovinní sérum albumin). Stejným způsobem byla tato larvální stádia opakovaně promyta kultivačním médiem (3x). Následně byla do kultivační misky přidána antibiotika – 0,5% penicilin, streptomycin a amphotericin B (100X; BioWHittaker 17-745-E). Kultivační miska byla umístěna do laboratorního inkubátoru s teplotou nastavenou na 37 °C a 5% atmosférou CO₂ (postup *in vitro* kultivace podle Chanová a kol. 2009). Schistosomula byla sbírána po jednodenní nebo třídenní inkubaci.

3.7 Izolace a sběr rozpustných exkrečně-sekrečních produktů cercárií *T. regenti* a *T. szidati*

3.7.1 Indukce vyprazdňování penetračních žláz cercárií a sběr exkrečně-sekrečních produktů

K indukci vyprazdňování penetračních žláz cercárií byla použita kyselina linolová v koncentraci 0,1 µg/ml pro oba druhy motolic (Mikeš a kol. 2005). Pro stimulaci vylučování exkrečně-sekrečních (E-S) produktů penetračních žláz byly cercárie inkubovány s touto látkou po dobu 30 minut. Poté byly cercárie odfiltrovány pomocí filtrů Millex VV 0,1 µm (Millipore). K vzorkům nebyly přidávány inhibitory. Pro zvýšení koncentrace proteinů byly vzorky ultrafiltrovány pomocí filtračních jednotek Amicon Ultra 15 (Millipore) propouštějící proteiny s molekulovou hmotností nižší než 10 kDa. V případě E-S produktů *T. regenti* byly také použity filtry propouštějící proteiny s molekulovou hmotností nižší než 3 kDa. Ultrafiltrace probíhala při 4 °C a její doba se pohybovala mezi 80 – 140 min (v závislosti na původním objemu vzorku a na velikosti použitých filtrů), při 4 500 – 5 000 g. Tyto filtry nebyly používány opakovaně. Získané E-S produkty byly uchovávány při teplotě - 80 °C.

3.7.2 Měření koncentrace proteinů

Měření koncentrace proteinů bylo provedeno v nesterilních 96 jamkových mikrotitračních destičkách s plochým dnem. Kalibrační řada byla vytvořena v rozmezí 0 – 4 µg pomocí standardů BSA. Celkový objem vzorku byl 10 µl. Do jamek bylo přidáno činidlo a postup odpovídal pokynům výrobce kitu (Quant – iTTM Protein Assay Kit). Změření fluorescence vzorků probíhalo při 470/570 nm (excitace/emise) na fluorometru Tecan – Infinite M 200 s využitím programu Magellan (verze 6.6).

3.7.3 Lyofilizace

Vzorky E-S produktů cercárií *T. regenti* i *T. szidati* byly zamrazeny v tekutém dusíku v mikrozkumavkách typu Eppendorf a následně byly takto skladované vzorky lyofilizovány. Lyofilizace probíhala cca 4 hodiny. Mikrozkumavky s vysušenými vzorky byly obaleny parafinovou folií a opět skladovány v - 80 °C.

3.7.4 Proteomická analýza

K proteomické analýze byly vzorky E-S produktů odeslány k Dr. Jason Mulvenna (James Cook University, Faculty of Medicine Health & Molecular Science, Cairns, Austrálie). Separace proteinových štěpů probíhá pomocí Agilent 3100 OFFGEL Fractionator. V porovnání s "in-gel" digescí je tato metoda více kompatibilní s dalším zpracováním hmotovou spektrometrií. Zpracování a vyhodnocování našich vzorků právě probíhá obdobnými metodami jako v publikaci Mulvenna a kol. (2009).

3.8 Využití světelné a fluorescenční mikroskopie při studiu odvrhování glykokalyxu cercárií ptačích schistosom

3.8.1 Barvení obsahu penetračních žláz cercárií

Barvení obsahu penetračních žláz bylo využito k pozorování distribuce obsahu penetračních žláz. K definovanému objemu vody s cercáriemi na podložním skle byly přidávány stimulační látky pro indukci vyprazdňování penetračních žláz – praziquantel nebo kyselina linolová – v koncentraci 0,1 µg/ml. Preferována byla kyselina linolová, protože se jedná o přirozený stimulant (Mikeš a kol. 2005). Inkubace se stimulačními látkami trvala 15 – 30 minut.

Následně byly živé cercárie druhů *T. regenti* a *T. szidati* společně s již sekretovaným obsahem penetračních žláz barveny 1% vodnými roztoky lithium karmínu a alizarinu. Ke značení sekretovaného obsahu postacetabulárních žláz byl také využit fluorochrom Alexa Fluor® 488 azidová forma (Invitrogen, A10266). Jak je popsáno v práci Ligasová a kol. (2011), Alexa Fluor® 488 se váže na sekreční vezikuly postacetabulárních žláz. Před použitím byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a ředěn v PBS. K cercáriím byl přidáván v koncentraci 20 µM.

Lithium karmín byl přidáván, stejně jako Alexa Fluor® 488, pro barvení produktů postacetabulárních žláz cercárií. Cirkumacetabulární žlázy a jejich sekretovaný obsah byly barveny alizarinem. Tato látka byla vybrána pro svou afinitu k vápníku, který je obsažen v tomto typu žláz (Puchtler a kol. 1969, Mikeš a kol. 2005). Obsah penetračních žláz značený alizarinem byl pozorován jak běžným světelným mikroskopem, tak i fluorescenčním mikroskopem (fluorescenční filtr Olympus U-MWG) (Ligasová a kol. 2011). Pro kontrolu byl sledován vliv samotného lithium karmínu, alizarinu a aplikace krycího sklíčka na chování cercárií, toto pozorování probíhalo po dobu 60 minut.

V případě lithium karmínu a alizarinu bylo chování cercárií pozorováno ihned po přidání vodných roztoků histologických barev. Při značení Alexa Fluor® 488 došlo po 15 minutách společné inkubace s cercáriemi k odsání vody s fluorescenční značkou a nahrazení odstátou vodovodní vodou. Ve všech případech barvení byly cercárie pozorovány mikroskopem Olympus BX51 po dobu 30 – 60 minut, s intervaly maximálně 5 minut. Fluorescence Alexa Fluor® 488 byla pozorována při excitaci/emisi: 495/519 nm (fluorescenční filtr Olympus U-MWIB). Mezi pozorováními byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokusy byly opakovány nejméně třikrát. Výstupy z těchto i následujících experimentů byly zaznamenávány pomocí fotografických programů DP Controller a QuickPHOTO MICRO 2.2. Takto získané fotografie byly následně upraveny v grafickém editoru.

3.8.2 Charakterizace sacharidových epitopů na povrchu cercárie pomocí fluorescenčně značených lektinů

Pro studium odvrhování glykokalyxu jsme zvolili postup značení povrchových sacharidů (glykokalyxu) cercárií. Ke značení povrchu cercárií jsme využili fluorescenčně značené lektiny. Dvanáct z celkově třinácti používaných lektinů (viz tab. 1) bylo značeno FITC (fluorescein-5-izothiokyanát). Lektin HPA byl značen Alexa Fluor® 488. Testované lektiny byly před použitím ředěny v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl₂.

Nejprve bylo testováno všech 13 lektinů pro svou vazbu na povrch cercárií a sekrety penetračních žláz těchto stádií. Intenzita vazby na povrch cercárií byla porovnávána s prací Podhorského a kol. (2009), popř. s výsledky z publikace Blažová a Horák (2005).

Následně byly pro tuto část experimentů vybrány lektiny JAC a UEA-I pro cercárie *T. regenti* a lektiny JAC, LCA a PSA pro cercárie *T. szidati*. Lektin UEA-I byl zvolen na základě dřívějších studií (Blažová a Horák 2005, Chanová a kol. 2009), podle kterých se neváže na povrch schistosomul *Trichobilharzia regenti*, ale na povrch cercárií tohoto druhu se váže. Proto jsme předpokládali, že by se po odvržení glykokalyxu neměl znovu navázat na povrch transformujících se larev. U cercárií *T. szidati* byl z tohoto důvodu vybrán lektin LCA (Horák 1995, Horák a kol. 1998b).

Postup inkubace byl podobný jako v kapitole 3.8.1. K definovanému objemu vody s cercáriemi na podložním skle byl přidán 10 mM HEPES pufr pH 7,2 s 1 mM CaCl₂ a vybrané lektiny v koncentraci 20 µg/ml. Nakonec byla přidána stimulační látka – kyselina linolová v koncentraci 0,1 µg/ml. Cercárie byly pozorovány po dobu 30 – 60 minut fluorescenčním

mikroskopem Olympus BX51 (fluorescenční filtr Olympus U-MWIB). Mezi pozorováními byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokusy byly opakovány nejméně třikrát.

3.8.3 Charakterizace sacharidových epitopů různě starých schistosomul *T. regenti* pomocí fluorescenčně značených lektinů

K charakterizaci sacharidových epitopů různě starých schistosomul *T. regenti* bylo využito vazeb fluorescenčně značených lektinů (viz tab. 1). Výsledky z těchto pokusů byly následně porovnávány s výsledky získanými charakterizací sacharidových epitopů u cercárií *T. regenti* (Podhorský a kol. 2009, viz kapitola 4.2.2). Porovnání sacharidových profilů cercárií a schistosomul umožňuje sledování změn v glykosylaci povrchu cercárií při transformaci na schistosomula.

Různě stará schistosomula *T. regenti* (1,5 hodinové *ex vivo*; 1 denní *in vitro* a 3 denní *ex vivo*, viz kapitoly 3.5 a 3.6) v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl₂ a 150 mM NaCl byla aplikována na podložní sklíčko. Následovala inkubace s lektiny, která probíhala v temnu po dobu 20 minut (seznam lektinů viz tab. 1). Lektiny byly používány v koncentraci 20 µg/ml, inkubace probíhala při pokojové teplotě. Během inkubace byla podložní sklíčka skladována ve vlhké komůrce. Hodnocení intenzity fluorescence lektinů na živých schistosomulech bylo odečítáno pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX51 (fluorescenční filtr U-MWIB).

Jako kontrola byla schistosomula inkubována s lektinem, ke kterému byl přidán specifický sacharidový inhibitor (viz tab. 1) v koncentraci 0,1 M (v případě sacharidových inhibitorů UEA-I a LTA) nebo v koncentraci 0,2 M (v případě všech ostatních sacharidových inhibitorů lektinů). Před aplikací byl lektin inkubován se svým sacharidovým inhibitorem 30 minut ve tmě při 4 °C. Pokusy byly opakovány třikrát.

3.8.4 Podíl lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a na stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti in vitro*

U cercárií *Schistosoma mansoni* bylo prokázáno, že některé lektiny indukují vyprazdňování penetračních žláz. Sekrece obsahu penetračních žláz je inhibována přidáním specifických sacharidových inhibitorů jednotlivých lektinů (Coles a kol. 1988). Recentní studie o *in vitro* transformaci miracidí na sporocysty u motolice *Fasciola hepatica* ukazuje na stimulaci tohoto procesu pomocí lektinů, které specificky rozpoznávají povrch miracidí (Georgieva a

kol. 2012). Transformace není indukována v případě přítomnosti specifických inhibičních sacharidů. Výsledky této studie naznačují možný vliv interakcí lektinů s povrchovými sacharidy na stimulaci transformace miracidii na sporocysty nejen v *in vitro* podmínkách.

Pro pochopení dalšího textu je potřeba uvést výsledky z kapitol 4.2.1 a 4.2.2. Naše experimenty ukázaly, že sekrety z cirkum- i postacetabulárních penetračních žláz cercárií se vážou na celý povrch těla. Cercárie se obalují obsahem žláz a postupně tímto obsahem za pomoci penetračních pohybů prolézají a následně ho téměř úplně ze svého povrchu odvrhují a zanechávají za sebou tunel obsahu penetračních žláz. Společně se sekretovaným obsahem penetračních žláz je odvrhován i glykokalyx (bližší informace viz kapitoly 4.2.1 a 4.2.2).

My jsme testovali 13 lektinů různých specifit (viz tab. 1), ve 3 různých koncentracích (bez přítomnosti stimulantu), poté jsme sledovali jejich vliv na indukci vyprazdňování penetračních žláz cercárií a podíl na stimulaci tvorby tunelu (viz výše). Cercárie v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl_2 byly inkubovány na podložním sklíčku s lektiny v koncentracích 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. Inkubace probíhala ve tmě, při pokojové teplotě. Chování cercárií bylo pozorováno fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 (fluorescenční filtr Olympus U-MWIB). Cercárie byly sledovány 60 minut, s intervaly maximálně 5 minut. Mezi pozorováními byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokusy byly opakovány třikrát.

3.8.5 Vliv sacharidových inhibitorů lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a na stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti* *in vitro*

Z předchozích pokusů jsme věděli, že lektiny mají vliv na indukci vyprazdňování penetračních žláz a na stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti* v *in vitro* podmínkách (viz kapitola 4.3). Naším záměrem bylo zjistit, zda jsou tyto procesy specificky či nespecificky indukovány lektiny. Z tohoto důvodu byly lektiny inkubovány se sacharidovými inhibitory, které inhibují vazbu lektinů. Ale také s neinhibujícími sacharidy, pro které nemá daný lektin prioritní vazebné preference. Po přidání k cercáriím byl hodnocen vliv různých kombinací lektin – sacharidový inhibitor na chování cercárií (např. indukce sekrece žláz). Specifická reakce lektinu se prokázala nenavázáním lektinu, který byl inkubován se svým sacharidovým inhibitorem. V našem případě by také mělo dojít k zainhibování procesu odvrhování glykokalyxu. V opačném případě nedošlo k zainhibování vazby lektinu.

Testovány byly lektiny, u kterých bylo prokázáno, že se podílí na stimulaci odvrhování glykokalyxu (viz. 4.3). Jedná se o lektiny UEA-I, LTA, Con A, LCA, SBA a JAC. Lektiny v koncentraci 20 µg/ml byly inkubovány se sacharidem 30 minut ve tmě při 4 °C. Sacharidy byly na základě doporučení distributora nejprve používány v koncentraci 0,1 M (v případě sacharidových inhibitorů UEA-I a LTA) a v koncentraci 0,2 M (v případě všech ostatních sacharidových inhibitorů lektinů). Vliv sacharidových inhibitorů na odhazování ocásků, sekreci obsahu penetračních žláz apod. byl omezen přidáváním nižších koncentrací tak, aby i nadále docházelo k zainhibování vazby lektinu na povrch cercárií. Používaná koncentrace všech sacharidů nakonec byla 0,1 M, kdy stále docházelo k inhibici vazby lektinů na cercárie a zároveň chování cercárií bylo ovlivněno jen nepatrně.

Experimenty se sacharidovými inhibitory probíhaly ve třech odlišných postupech. Nejprve jsme zjišťovali, zda je možné zainhibovat odvrhování glykokalyxu cercárií stimulovaného lektiny pomocí jejich sacharidových inhibitorů (viz tab. 1). Následně jsme testovali sacharidy, pro které nemají vybrané lektiny vazebnou preferenci. Opět bylo testováno stejných šest lektinů v různých kombinacích se třemi sacharidovými inhibitory – Fuc, MetMan/MetGlc a Gal/GalNAc – testované kombinace viz tab. 2. Po inkubaci lektinů se sacharidy byla tato směs přidávána k cercáriím v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1mM CaCl₂.

Tab. 2: Lektiny indukující odvrhování glykokalyxu u cercárií a testované kombinace sacharidů, k nimž lektin nemá vazebné preference.

LEKTIN	INHIBITOR
UEA-I	MetMan/MetGlc
	Gal/GalNAc
LTA	MetMan/MetGlc
	Gal/GalNAc
ConA	Fuc
	Gal/GalNAc
LCA	Fuc
	Gal/GalNAc
SBA	Fuc
	MetMan/MetGlc
JAC	Fuc
	MetMan/MetGlc

Vysvětlivky: ● lektiny se specifitou k Fuc, Fuc inhibitor, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, MetMan/MetGlc inhibitor, ● lektiny se se specifitou k Gal/GalNAc, Gal/GalNAc inhibitor.

Poslední experimenty se sacharidy byly založeny na inkubaci lektinů indukujících odvrhování glykokalyxu u cercárií s jejich sacharidovým inhibitorem. Tato směs byla následně přidána k cercáriím v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl₂ na dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby jsme k těmto cercáriím přidali lektin jiné sacharidové specifity než námi testované lektiny (PSA, WGA), který se váže na jejich povrch, ale nebyl prokázán jeho vliv na indukci odvrhování glykokalyxu u cercárií (zvolené kombinace viz tab. 3). Ihned po přidání těchto lektinů byla hodnocena jejich vazba na povrch cercárií a probíhalo vyhodnocení specifity lektinů v procesu stimulace odvrhování glykokalyxu u cercárií.

Jako kontroly sloužily cercárie inkubované se samotným sacharidovým inhibitorem (detekce vlivu na indukci vyprazdňování penetračních žláz probíhala pomocí lithium karmínu) nebo lektinem opět v koncentraci 20 µg/ml (v prostředí 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl₂). Při testování inhibitorů jsme zároveň sledovali specifitu vazby lektinu na povrch cercárií a vliv inhibitorů na indukci vyprazdňování penetračních žláz cercárií. Chování cercárií a vazba lektinů na jejich povrch bylo hodnoceno mikroskopem Olympus BX51 (fluorescenční filtr Olympus U-MWIB). U prvních dvou postupů byly cercárie pozorovány 60 minut, s intervaly maximálně 5 minut. Mezi pozorováními a během inkubačních dob byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokusy byly opakovány nejméně třikrát.

Tab. 3: Lektiny indukující odvrhování glykokalyxu u cercárií se svými sacharidovými inhibitory. Přidávané lektiny jiné specifity, které se vážou na povrch cercárií, ale nestimulují odvrhování glykokalyxu.

LEKTIN – indukující odvrh. glykokalyxu, reagující nebo nereagující s povrchem cercárií	VAZBA NA POVRCH CEREKÁRIE	SPECIFICKÝ INHIBITOR	LEKTIN – neindukuj. odvrh. glykokalyxu, vázající se na povrch cercárií, jiné specifity
UEA-I	+	Fuc	PSA
LTA	+	Fuc	PSA
Con A	+	MetMan/MetGlc	WGA
LCA	+	MetMan/MetGlc	WGA
SBA	-	GalNAc	PSA
JAC	+	Mel/GalNAc	PSA

Vysvětlivky: ● lektiny se specifitou k Fuc, Fuc inhibitor, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, MetMan/MetGlc inhibitor, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se se specifitou k Gal/GalNAc, Gal/GalNAc inhibitor, + pozitivní reakce, - bez reakce.

3.8.6 Vazba lektinů, alizarinu a lithium karmínu na sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti*

Cílem tohoto experimentu bylo sledování vazby lektinů a 1% vodných roztoků lithium karmínu nebo alizarinu na sekrety penetračních žláz, které adherovaly na podložní sklíčko. Zajímalo nás, zda dochází k vazbě na stejný typ sekretů.

Experimenty se prováděly dvěma odlišnými způsoby. V prvním případě byly cercárie v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1 mM CaCl_2 inkubovány s lektiny UEA-I a LTA v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. Tyto lektiny indukují vyprazdňování penetračních žláz a zároveň se na tento obsah vážou (viz 4.2.2 a 4.3). Po 15 – 30 minutové inkubaci cercárií s lektinem byl přidáván lithium karmín nebo alizarin v co nejmenším možném množství. Pro přidávané množství těchto histologických barviv byl vysledován vhodný poměr, který nepřebíjel signál při značení lektinem. V druhém případě byl k cercáriím na 15 – 30 minut přidán stimulant k vyprazdňování penetračních žláz (kyselina linolová v koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$). Následně byly sekrety penetračních žláz a cercárie v 10 mM HEPES pufru pH 7,2 s 1mM CaCl_2 značeny lektinem PSA nebo LCA (v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$) a ihned poté také alizarinem nebo lithium karmínem, opět v co nejmenším možném množství. Testován byl i obrácený postup přidávání jednotlivých látek po inkubaci s kyselinou linolovou. Nejprve byl přidáván lithium karmín nebo alizarin a poté až lektin (PSA, LCA).

Cercárie se sekretovaným obsahem penetračních žláz byly pozorovány po dobu 30 – 60 minut mikroskopem Olympus BX51 i s fluorescencí, viz např. kapitola 3.8.2. Mezi pozorováními byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokus byl opakován nejméně třikrát.

3.8.7 Značení sekretů penetračních žláz pomocí CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)

Paveley a kol. (2009) ve své práci používali ke studiu živých cercárií *Schistosoma mansoni* ester CFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, komerční název: Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen). Pomocí této látky zkoumali interakce mezi antigeny schistosom a buňkami imunitního systému hostitele. Jejich práce dokumentuje vazbu této látky na obsah acetabulárních žláz cercárií *S. mansoni*.

My jsme testovali ester CellTrace™ CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) Cell Proliferation Kit (Invitrogen, C34554). Jedná se o stejný ester jako v případě

CFDA-SE, tyto látky se liší jen komerčním názvem. CFSE je stejně jako ester CFDA-SE znám svou pasivní difúzí do buněk, kde je štípán volnými esterázami. Sukeinimidová skupina se poté kovalentně váže na volné aminy na proteinech. Po navázání dochází k tvorbě fluorescenčních konjugátů. CFSE je využíván i při studiu jiných parazitů, jako příklad lze uvést migraci larev *Toxocara canis* hostitelem v práci Kolbeková a kol. (2011).

Postup přípravy odpovídal pokynům výrobce komerčního kitu. Lyofilizovaný prášek CFSE byl rozpuštěn v DMSO. Cerkárie byly inkubovány s CFSE v koncentraci 20 μM 1,5 hodiny. Distributor doporučuje delší inkubace (2 – 3 hodiny), ale Paveley a kol. (2009) uvádějí jako optimální použitou koncentraci a dobu inkubace 20 μM CFDA-SE po dobu 60 minut. Po inkubaci byl sledován vliv samotného esteru na cercárie – zdali indukuje vyprazdňování penetračních žláz apod. Poté následovalo přidání kyseliny linolové (v koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$), pozorování chování cercárií a změn v distribuci sekretů žláz značených CFSE. Cerkárie byly pozorovány 30 – 60 minut mikroskopem Olympus BX51 (fluorescenční filtr U-MWIB). Intervaly mezi pozorováními byly maximálně 5 minut. Mezi pozorováními byla podložní sklíčka uložena ve vlhké komůrce. Pokus byl opakován třikrát.

3.9 Vliv aktivní rekombinantní formy katepsinu B2 na odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*

U cercárií *Schistosoma mansoni* se předpokládá, že se na odvrhování glykokalyxu podílí serinové proteázy z penetračních žláz (Marikovsky a kol. 1988a). Proto jsme se rozhodli otestovat, zda by se u cercárií *Trichobilharzia regenti* nemohla na odvrhování glykokalyxu podílet cysteinová peptidáza katepsin B2, která je přítomna v jejich postacetabulárních žlázách (Mikeš a kol. 2005, Kašný a kol. 2007, Dolečková a kol. 2009, více viz 2.2.1.2).

Naše pokusy byly založeny na inkubaci cercárií s aktivní rekombinantní formou katepsinu B2 (CB2) v koncentracích 0,1; 0,05; 0,02; 0,015; 0,01; 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a následným značením lektinem. Samotný pokus nadále probíhal s koncentrací 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, která nejméně ovlivňovala sekreci obsahu penetračních žláz, odhazování ocásku apod. Inkubace cercárií s CB2 trvala 15 – 30 minut. Jako kontrola sloužily cercárie bez katepsinu. Vzorek i kontrola byly následně značeny s lektiny řadícími se mezi lektinové markery transformace (UEA-I, PNA) (viz 4.2.3) a bylo posouzeno, zda měla peptidáza vliv na odvržení glykokalyxu cercárií. Pokus byl opakován nejméně třikrát.

3.10 Vliv inhibitorů peptidáz na odvrhování glykokalyxu

V návaznosti na experimenty s endogenní peptidázou (CB2) z penetračních žláz cercárií, která by se mohla účastnit odvrhování glykokalyxu, jsme se rozhodli otestovat vybrané inhibitory peptidáz. Experimenty s inhibitory peptidáz jsme se pokoušeli zjistit, které další peptidázy by se mohly podílet na odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom. V případě účasti dané peptidázy na tomto procesu by docházelo k blokování tohoto procesu inhibitorem této peptidázy. Byly vybrány inhibitory tří skupin peptidáz: cysteinových, serinových a metalopeptidáz (viz tab. 4).

Tab. 4: Seznam testovaných inhibitorů, jejich specifita, použita a efektivní koncentrace.

INHIBITOR	CÍLOVÁ SKUPINA PEPTIDÁZ	POUŽITÁ KONCENTRACE	DOPORUČENÁ KONCENTRACE (dle výrobce)
Leupeptin	Serinové a cysteinové/ reversibilní	100 µM	10-100 µM
Aprotinin	Serinové/ reversibilní	2 µg/ml	0,6-2 µg/ml
TLCK	Serinové/ireversibilní	100 µM	10-100 µM
E-64	Cysteinové/ireversibilní	10 µM	1-10 µM
E-64d	Cysteinové/ireversibilní	10 µM	1-10 µM
EDTA	metalopeptidázy	5 mM	1-10 mM
EGTA	metalopeptidázy	5 mM	1-10 mM

Vysvětlivky: ● inhibitory serinových peptidáz, ● inhibitory cysteinových peptidáz, ● inhibitory metalopeptidáz.

Ze skupiny inhibitorů serinových peptidáz byly testovány reverzibilní i ireverzibilní inhibitory. Testovanými reverzibilními inhibitory byly aprotinin (A1153) a leupeptin (L2884), ireverzibilními TLCK (90182, N-Tosyl-L-lysine chloromethyl keton). EGTA (E3889, ethylenglykolocotová kyselina) a EDTA (E9884, ethylendiamintetraoctová kyselina) byly vybrány jako zástupci inhibitorů metalopeptidáz a chelátorů vápenatých iontů, které jsou bohatě přítomny v cirkumacetabulárních žlázách *T. regenti* a *T. szidati* (Mikeš a kol. 2005). Z širokospektrých inhibitorů cysteinových peptidáz byly testovány E-64 (E3132, trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butan) a E-64d (E8640), který je membránou propustným analogem inhibitoru E-64c (syntetický analog E-64, membránou neprocházející).

Použité koncentrace inhibitorů jsou shrnuty v tabulce 4. Postup experimentu byl následující: cercárie byly inkubovány s inhibitorem (15 – 30 minut), poté jim byl dodán stimul k vyprazdňování penetračních žláz (kyselina linolová v koncentraci 0,1 µg/ml). Jako

kontrola sloužily cercárie inkubované s inhibítorem, ale bez stimulantu. Chování cercárií (odhození ocásku, indukce sekrece žláz a tvorba tunelu) bylo detekováno pomocí lektinů (UEA-I, JAC) nebo 1% vodného roztoku lithium karmínu.

3.11 Imunocytochemie

Lewis X antigen je důležitou součástí povrchu určitých lidských buněk a byl také detekován na povrchu některých stádií *S. mansoni* (více viz 2.3.1.1). Naše experimenty byly zaměřeny na zjištění výskytu Le^x antigenu u ptačích schistosom. K lokalizaci tohoto antigenu na povrchu různých stádií ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti* byla použita monoklonální protilátka anti-CD15 (MEM 158, IgM získaná z osobních zdrojů prof. V. Hořejšího, Ústav molekulární genetiky, Akademie věd České republiky). Jednotlivá stadia *T. regenti* byla zpracována s drobnými obměnami podle protokolu Nyame a kol. (2003). Testování probíhalo na cercáriích, dospělých, *in vitro* (1 a 3 denní) i *ex vivo* (1,5 hodinové, 1, 3, 5 a 7 denní) získaných schistosomulech. Jednotlivá stadia byla nejprve fixována ve 4% formaldehydu přes noc při 4 °C, poté 6 x promyta v PBS (pH 7,2). Následovalo blokování roztokem 3% BSA v PBS 1 hodinu a inkubace 2 hodiny s primární protilátkou anti-CD15 v koncentraci 10 µg/ml (ředěno 3% BSA v PBS). Poté byla jednotlivá stadia 4 x promyta chlazeným PBS a následně inkubována 1 hodinu s kozí anti-myší IgM sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor® 488 (ředěno 1:200 3% BSA v PBS) (Invitrogen). Nakonec následovalo promytí (3x) v PBS a zamontování vzorků do Vectashield mounting medium H-1000 (Vector Laboratories). Výstup z tohoto značení byl analyzován pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX 51 a konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 s AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) systémem. Zároveň jsme testovali dva typy negativních kontrol s jednotlivými stadii. U první negativní kontroly byla vynechána primární protilátka, u druhé byla primární protilátka nahrazena myším sérem ze zdravé myši (ředěno 1:50 3% BSA v PBS). Pozitivní kontrolou byly cercárie a schistosomula *Schistosoma mansoni*, u kterých byla přítomnost Lewis X antigenu na povrchu prokázána ve studii Nyame a kol. (2003).

3.12 Elektronová mikroskopie

3.12.1 Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM)

Vzorkem pro TEM byla schistosomula *T. regenti* získaná *ex vivo* po penetraci kůže na dolních končetinách kachen. Kachny byly usmrčeny ihned po 45 minutové expozici cercáriím (nákaza kachen a zpracování materiálu viz kapitola 3.4 a 3.5).

Schistosomula byla fixována v 2,5% glutaraldehydu 30 minut v pufru se stabilizátorem membrán (pufr 1, viz kapitola 3.2, pufr bez stabilizátoru membrán (pufr 2) byl používán i nadále při promývání v procesu zpracování vzorků pro TEM), následně 90 minut ve stejné fixáži bez stabilizátoru membrán (pufr 2). Fixace probíhala za pokojové teploty. Po fixaci byla schistosomula 3x promyta v pufru 2. Následovala hodinová postfixace v 1% OsO₄ za pokojové teploty. Po postfixaci následovalo promytí (3x) a odvodňování etanolovou řadou 30%, 50%, 70% a 80% à 15 min, 90%, 96% à 5 min a 100% etanol 3 x 5 min. Vzorky byly poté převedeny do 100% acetonu (3 x 5 min).

Dalším krokem bylo prosycování zalévací pryskyřicí Spurr (Polysciences, Inc.): aceton:pryskyřice 3:1 2 hodiny, 1:1 4 hodiny, 1:3 6 – 12 hodin. Poté byly vzorky převedeny do čisté pryskyřice (3 x 12 hodin) a umístěny do speciálních mikrozkušavek. Po zalití byly tyto mikrozkušavky vloženy do termostatu, kde materiál polymeroval při 60 °C po dobu 48 hodin. Řezání bločků na ultratenké řezy (60 – 70 nm) bylo zadáváno pracovišti LEM při PřF UK v Praze. Tyto řezy byly nanесeny na sítky s ultratenkou mřížkou. Následovalo klasické kontrastování octanem uranyle a citrátem olova a pozorování na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 při urychlovacím napětí 80 kV s CCD kamerou Veleta. Fotografie byly zaznamenávány pomocí akvizčního softwaru Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

4 Výsledky

4.1 Sběr rozpustných exkrečně-sekrečních produktů cercárií *T. regenti* a *T. szidati*

4.1.1 Měření koncentrace proteinů

Výtěžnost sběru rozpustných exkrečně-sekrečních produktů byla 193 µg proteinu na přibližně 15 000 cercárií *Trichobilharzia regenti*. Celkový výtěžek byl cca 2 mg proteinu. U cercárií *T. szidati* byl výtěžek po 3 sběrech (odpovídajících odhadem 150 tisícům cercárií) 1,5 mg proteinu.

4.1.2 Proteomická analýza

Proteomická analýza E-S produktů probíhá, výsledky zatím nemáme k dispozici. Po jejich získání máme v plánu porovnání žlázového proteomu cercárií *T. regenti* a *T. szidati* s proteomem cercárií *Schistosoma mansoni* a *S. japonicum*, viz publikace Curwen a kol. (2004), Knudsen a kol. (2005) a Dvořák a kol. (2008).

4.2 Studium odvrhování glykokalyxu cercárií ptačích schistosom pomocí světelné a fluorescenční mikroskopie

4.2.1 Barvení obsahu penetračních žláz cercárií

V rámci experimentů s indukcí vyprazdňování penetračních žláz a stimulací odvrhování glykokalyxu v *in vitro* podmínkách jsme sledovali vliv samotného alizarinu a lithium karmínu na cercárie. Zajímalo nás zároveň ovlivnění cercárií při použití krycího sklíčka.

V přítomnosti samotného alizarinu cercárie odhazovaly ocásky, sekretovaly obsah penetračních žláz, křečovitě se stahovaly, ale tvorba tunelu ze sekretů penetračních žláz nebyla pozorována (bližší vysvětlení viz dále). Lithium karmín ovlivňoval cercárie v mnohem menší míře. Neměl vliv na pohyblivost cercárií, sekreci obsahu penetračních žláz indukoval velmi málo a až po delší době. S postupem času (nad 30 minut) docházelo ke zvýšení sekrece obsahu penetračních žláz. Tvorba tunelu také nebyla pozorována.

Krycí sklíčko má vliv na přichytávání cercárií acetabulem k podkladu, ale to je sledováno i u cercárií volně se pohybujících na podložním sklíčku. Hlavním negativem

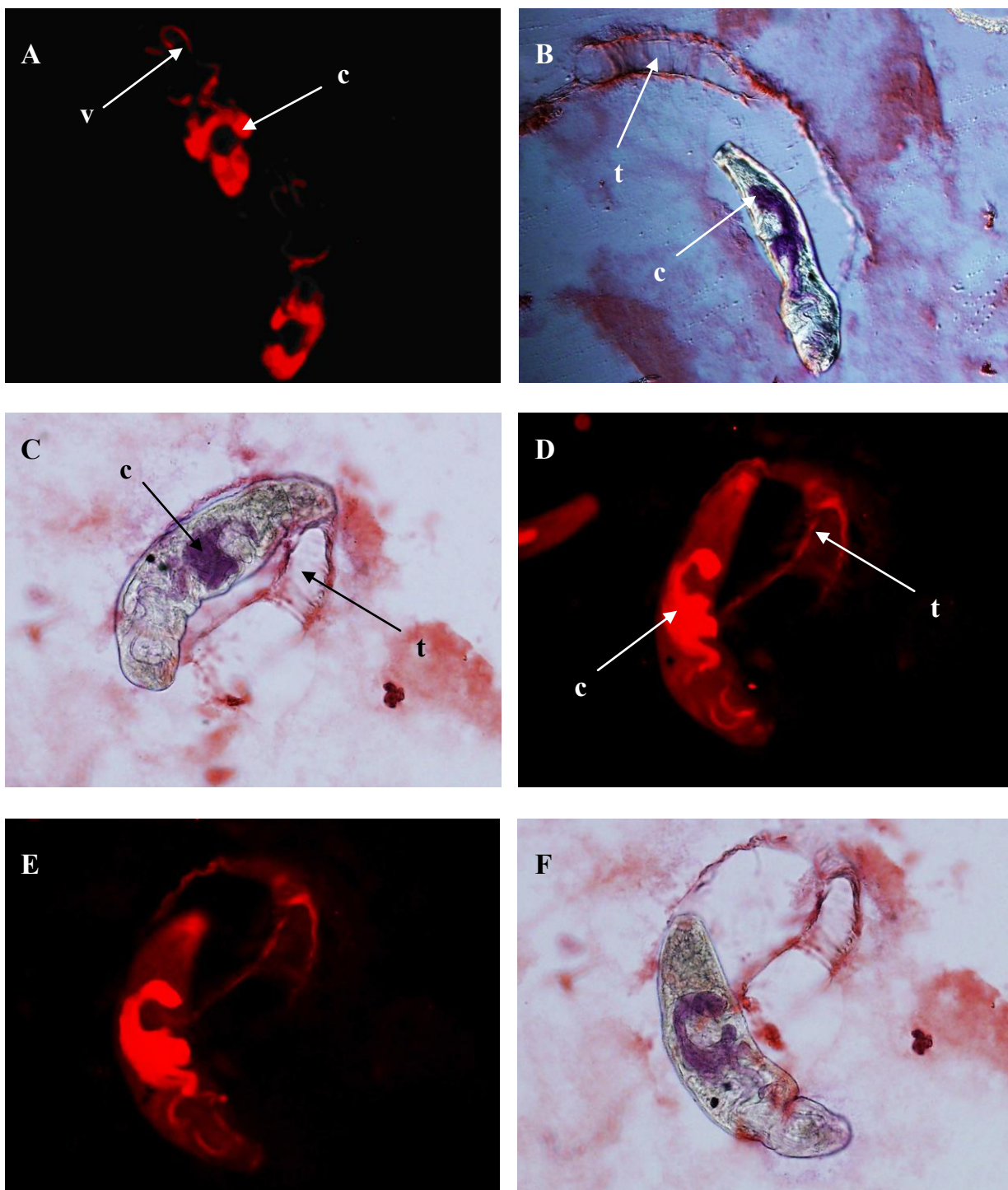
krycího sklíčka byla zvýšená mortalita cercárií. Tento jev byl patrně spojen s nedostatkem vody a následným vysycháním této tekutiny. V některých případech docházelo k urychlení námi sledovaných procesů vlivem krycího sklíčka. Ale jiný vliv na chování cercárie nebyl pozorován.

Po indukci vyprazdňování penetračních žláz kyselinou linolovou bylo pozorováno chování cercárií se zaměřením na tvorbu tunelu ze sekretů penetračních žláz. Značení tohoto procesu probíhalo přidáním histologických barviv (alizarinu a lithium karmínu) a Alexa Fluor® 488 azidové formy, které se vážou na sekrety penetračních žláz a s výjimkou lithium karmínu i na samotné penetrační žlázy.

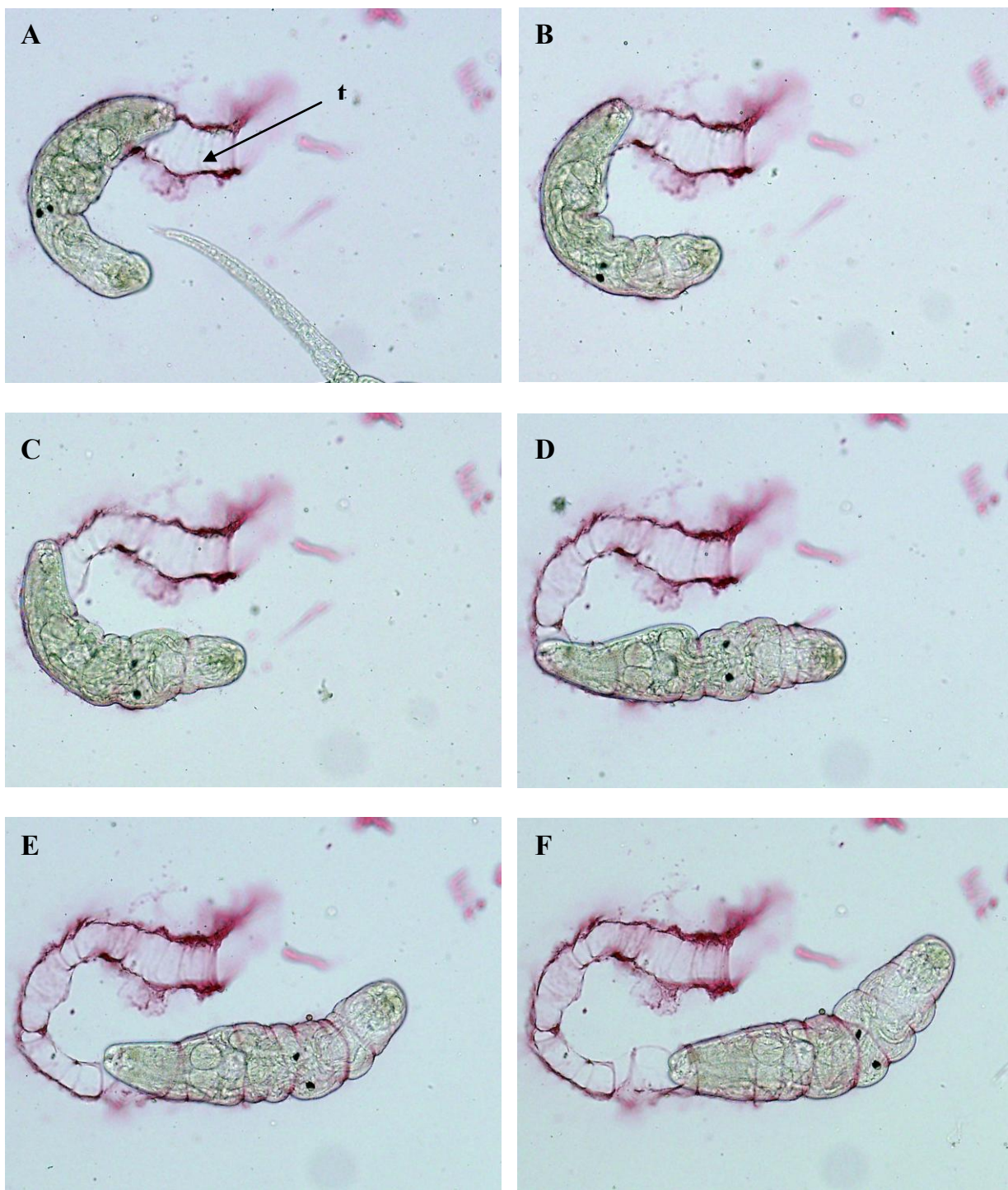
Pro barvení cirkumacetabulárních žláz a jejich produktů byl přidáván alizarin (obr. 6). Fotografie byly pořízené jak světelnou, tak i fluorescenční mikroskopií. Tyto obrázky ukazují navázání obsahu cirkumacetabulárních penetračních žláz na celý povrch cercárií. Cercárie se nejprve obalí sekrety penetračních žláz. Postupně tímto obsahem prolézají. K tomuto procesu využívá penetrační pohyby reprezentované opakovaným natahováním a stahováním těla. Tyto pohyby napomáhají k odvrhování sekretů z povrchu cercárie. Při těchto pohybech dochází k zužování a rozšiřování těla cercárie, v místě zaškrcení jsou odvrhované sekrety více nahloučené, jak je ukázáno na fotografii v podobě prsténkovitých ztlustěnin. Odvrhování adheovaných sekretů penetračních žláz začíná od předního konce těla cercárie směrem dozadu. Nakonec dochází k odvržení sekretů penetračních žláz z povrchu cercárie a zanechání tohoto materiálu za tělem cercárie v podobě tunelu (viz obr. 6B)

Obdobná sekvence fotografií byla získána i po obarvení postacetabulárních žláz a jejich produktů lithium karmínem (obr. 7) a Alexa Fluor® 488 (obr. 8). I v tomto případě cercárie prolézaly obsahem žláz a následně docházelo k úplnému odvržení obsahu žláz z povrchu cercárií. Tento proces nejlépe dokumentuje sekvence fotografií obrázku 7. Pozorování stejného fenoménu u sekretů obou typů penetračních žláz značených různými způsoby naznačuje přítomnost těchto látek současně v průběhu tvorby tunelu.

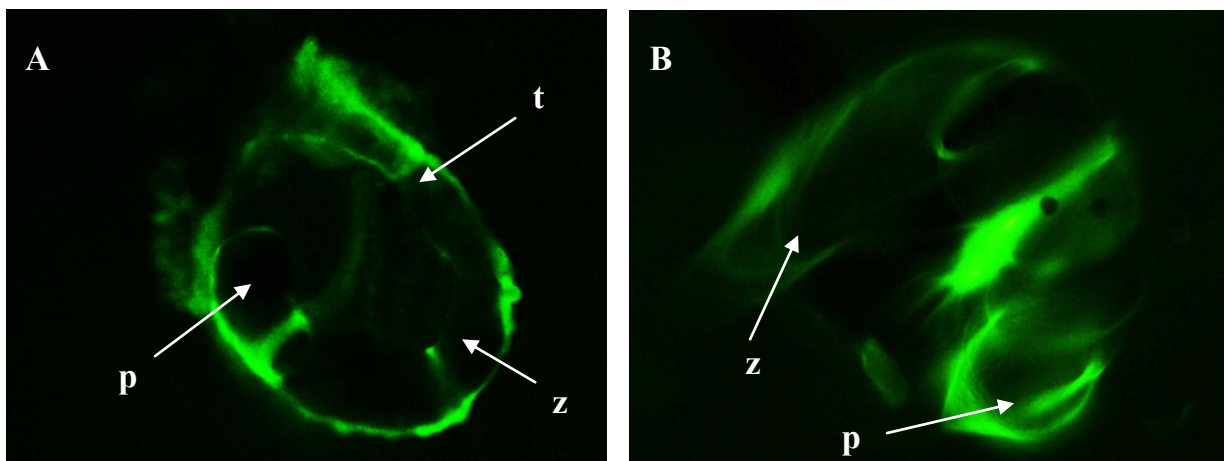
Doba trvání tvorby tunelu ze sekretů penetračních žláz byla zaznamenávána pouze u cercárií *Trichobilharzia szidati*. Tato doba byla značně proměnlivá. Pohybovala se od 2,5 minuty až po více jak 30 minut. Delší trvání odvrhování glykokalyxu bylo způsobeno zamotáním se cercárií do sekretů (ať už vlastních nebo cizích) penetračních žláz, popř. neodhozením ocásku. Některé cercárie i po vylezení z tunelu pokračovaly v sekreci obsahu penetračních žláz, ale v menší míře. Chování cercárií je individuální, a proto je problematické stanovit konkrétní čas, jak dlouho trvá cercárii tvorba tunelu ze sekretů penetračních žláz.



Obr. 6 A – F: Tvorba tunelu ze sekretů acetabulárních penetračních žláz cercárií *T. regenti*, značeno alizarinem. **A:** Cirkumacetabulární žlázy cercárií. **B:** Fázový kontrast cercárie tvořící tunel ze sekretů penetračních žláz. **c** cirkumacetabulární žlázy, **t** tunel ze sekretů penetračních žláz, **v** vývody cirkumacetabulárních žláz. Fotografie **A**, **D** a **E:** fluorescenční mikroskopie, fotografie **B**, **C** a **F:** světelná mikroskopie, **A – F:** zvětšení: 100x.



Obr. 7 A – F: Tvorba tunelu ze sekretů acetabulárních penetračních žláz cercárií *T. regenti*, značeno lithium karmínem. **t** tunel ze sekretů penetračních žláz, zvětšení: 100x.



Obr. 8 A, B: Tvorba tunelu ze sekretů penetračních žláz, značeno Alexa Fluor® 488. **p** přední konec těla cercárie, **t** tunel ze sekretů penetračních žláz, **z** zadní konec těla cercárie. **A:** zvětšení: 100x, **B:** zvětšení: 200x.

4.2.2 Charakterizace sacharidových epitopů na povrchu cercárie pomocí fluorescenčně značených lektinů

Lektiny se u cercárií vážou zejména na povrchové sacharidy (glykokalyx). Porovnání výsledků vazby lektinů na povrch cercárií a různě starých schistosomul bylo využito ke stanovení vhodných markerů transformace (blíže viz kapitola 4.2.3). V návaznosti na předchozí kapitolu (4.2.1) měly tyto experimenty odhalit, co se děje se sacharidy na povrchu cercárií v průběhu tvorby tunelu ze sekretů penetračních žláz. Zajímalo nás, zda dochází i k odvrhování glykokalyxu.

Po indukci vyprazdňování penetračních žláz kyselinou linolovou u cercárií *T. szidati* a *T. regenti* docházelo v přítomnosti lektinů, vázajících se na povrch cercárie a na sekretovaný obsah penetračních žláz, k navázání obsahu žláz na povrch cercárie. Následně cercárie prolézaly tímto obsahem a odvrhovaly ho pomocí penetračních pohybů z povrchu za současného vytváření tunelu (viz obr. 9 a 10). Společně se sekretovaným obsahem penetračních žláz byl odvrhován i glykokalyx. Docházelo k postupnému shrnování glykokalyxu od předního konce těla cercárie směrem dozadu k zadní části těla, k jizvě po ocásku (obr. 9 a 10). Následně vznikal tunel nebo kondenzovaný kroužek ze sekretů penetračních žláz a odvrženého glykokalyxu (viz obr. 9A). Odvržení glykokalyxu bylo demonstrováno absencí vazby lektinu na povrch cercárie.

Tabulka 5 shrnuje vazbu 13 lektinů na povrch cercárií a na sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti*. Výsledky experimentů s vazbou těchto vybraných lektinů na povrch

cerkárií se z velké části shodují s prací Podhorský a kol. (2009). Odlišnost se vyskytla v intenzitě vazby u 3 lektinů (Con A, WGA a RCA-I). Intenzita vazby lektinu RCA-I v našem experimentu byla výrazně nižší než ve výše jmenované práci. V našem případě se tento lektin nevázal specificky. Porovnání s prací Blažová a Horák (2005) ukázalo odlišnost v intenzitě vazby 2 lektinů (Con A a GSL-I). Tato studie hodnotila vazbu lektinu GSL-I na povrch cerkárií jako (+), ale výsledky naší studie společně s prací Podhorský a kol. (2009) ukazují, že se tento lektin neváže na povrch cerkárií *T. regenti* (-).

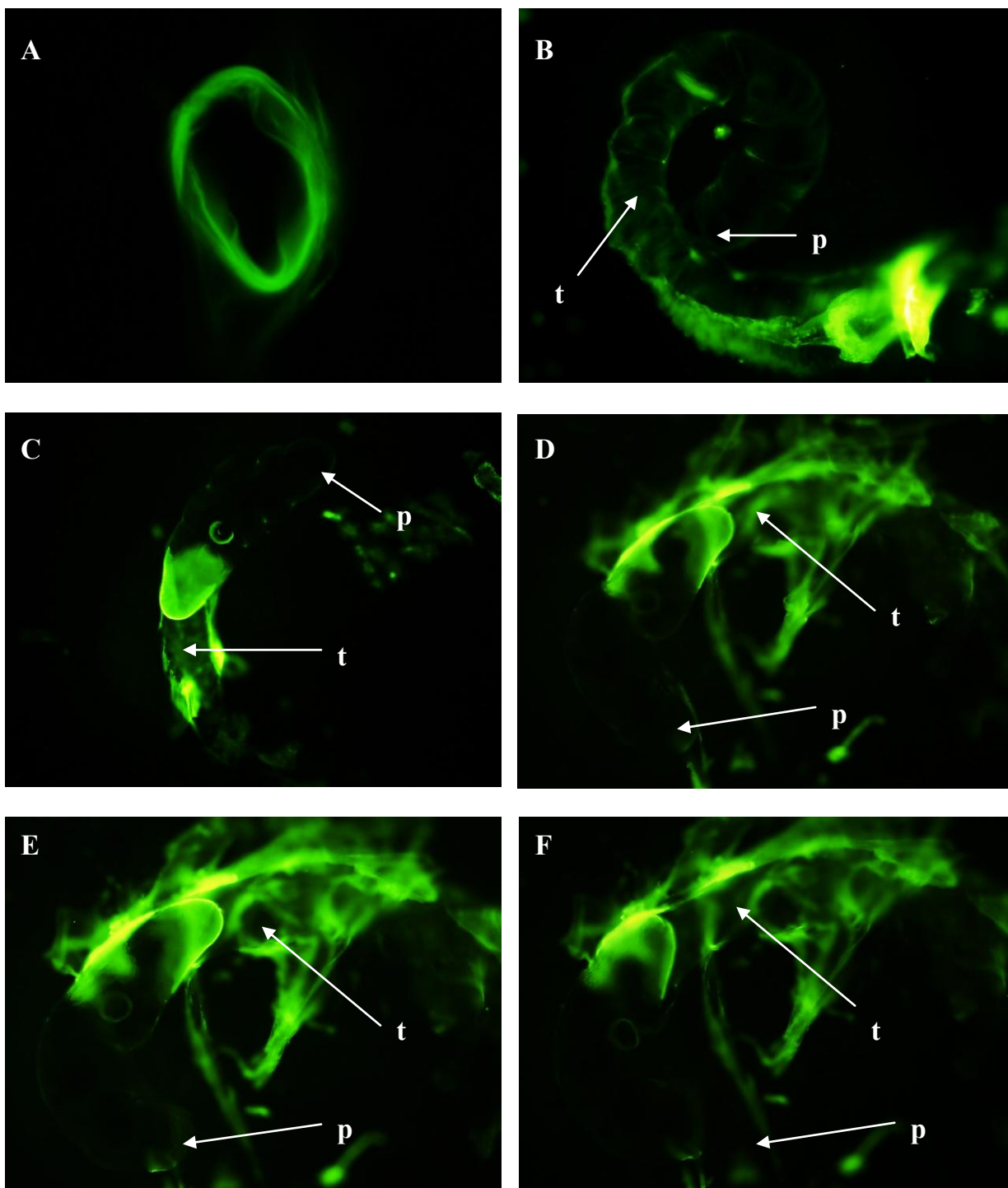
Vazba lektinů na sekrety penetračních žláz byla ve všech případech pozitivní a o vysoké intenzitě fluorescence (++). Ani v jednom případě se nezdařilo zainhibování vazby lektinů na sekrety penetračních žláz jejich sacharidovými inhibitory (více viz kapitola 4.4).

Tab. 5: Vazba fluorescenčně značených lektinů na povrch a sekrety penetračních žláz cerkárií *T. regenti*.

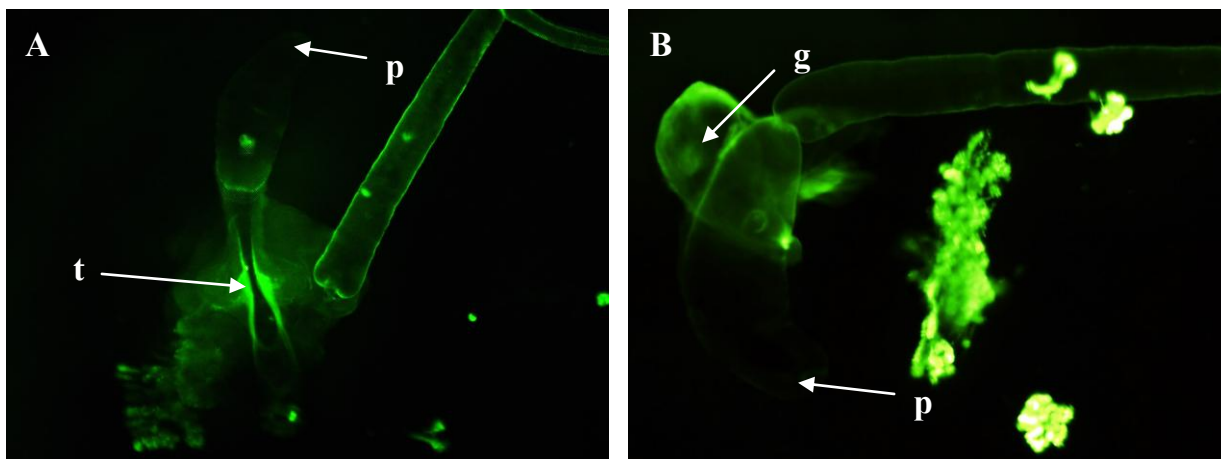
LEKTIN	VAZBA NA POVRCH T/O	VAZBA NA SPŽ	VAZBA NA POVRCH ¹	VAZBA NA POVRCH T/O ²
UEA-I	++/++	ANO	++	++/++
LTA	++/++	ANO	0	++/++
Con A	++/++	ANO	+	+/+
LCA	++/++	ANO	0	++/++
PSA	++/++	ANO	++	++/++
STA	-/-	ANO	-	0
WGA	+/-	ANO	0	(+)/-
SBA	-/-	ANO	0	-/-
GSL-I	-/-	ANO	(+)	-/-
PNA	-/-	ANO	0	-/-
RCA-I	(+)/(+)*	ANO	0	++/++
JAC	++/++	ANO	0	++/++
HPA	-/-	ANO	0	-/-

Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, 0 netestováno, ● lektiny se specifitou k Fuc, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se specifitou k Gal/GalNAc, * nespecifická reakce, T/O tělo/ocásek, SPŽ sekrety penetračních žláz.

Citace: ¹ Blažová a Horák (2005), ² Podhorský a kol. (2009).



Obr. 9 A – F: Odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*, značeno lektinem JAC. **A:** Odvržený glykokalyx v podobě kondenzovaného kroužku. **B:** Cercárie obalená v sekretech penetračních žláz a za ní vytvořený tunel. **C:** Cercárie prolézající sekrety penetračních žláz a odvrhující glykokalyx, který zanechává v tunelu. **D – F:** Sekvence fotek zachycující postupné odvrhování glykokalyxu – přední část těla cercárie již bez glykokalyxu, zadní část ještě s neodvrženým glykokalyxem. **p** přední konec těla cercárie, **t** odvržený glykokalyx a obsah penetračních žláz v podobě tunelu. **A:** zvětšení: 200x, **B – F:** zvětšení: 200x.



Obr. 10 A, B: Odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. szidati*, značeno lektiny, zvětšení: 100x. **A:** Lektin PSA. **B:** Lektin LCA. **g** odvržený glykokalyx, **p** přední konec těla cercárie, **t** odvržený glykokalyx a obsah penetračních žláz v podobě tunelu.

4.2.3 Charakterizace sacharidových epitopů různě starých schistosomul *T. regenti* pomocí fluorescenčně značených lektinů

Pomocí vazby fluorescenčně značených lektinů (viz tab. 1) na schistosomula druhu *T. regenti* se nám podařilo charakterizovat sacharidové epitopy na jejich povrchu (viz tab. 6). Experimenty probíhaly u 1,5 hodiny starých schistosomul po *in vivo* transformaci, 1 denních schistosomul po *in vitro* transformaci a 3 denních schistosomul po *in vivo* transformaci. Tyto výsledky nám zároveň umožnily porovnávat změny v sacharidových profilech povrchu cercárií (viz práce Podhorský a kol. 2009) a schistosomul, a tím sledovat změny v glykosylaci povrchu cercárií při transformaci na schistosomula.

Dle práce Podhorského a kol. (2009) a naší studie dochází u cercárií k vazbě lektinů se specifitou k Fuc (UEA-I a LTA), k Man/Glc (Con A, LCA a PSA), k GlcNAc (WGA) a GalNAc (JAC a RCA-I) (viz tab. 5).

Na 1,5 hodin stará schistosomula získané *in vivo* transformací se vážou lektiny se specifitou k Man/Glc (Con A, LCA, PSA) a k GalNAc (PNA, SBA, HPA). Zajímavý fenomén byl spatřen u lektinu UEA-I, kde docházelo u některých jedinců k vazbě lektinu jen na zadní část těla schistosomula a na přední části těla se lektin nevázal.

Na 1 denní schistosomula po *in vitro* transformaci se vážaly lektiny se specifitou k Man/Glc (LCA, PSA) a k GalNAc (PNA, SBA, HPA).

Na 3 denní schistosomula po *in vivo* transformaci se vážaly lektiny se specifitou k

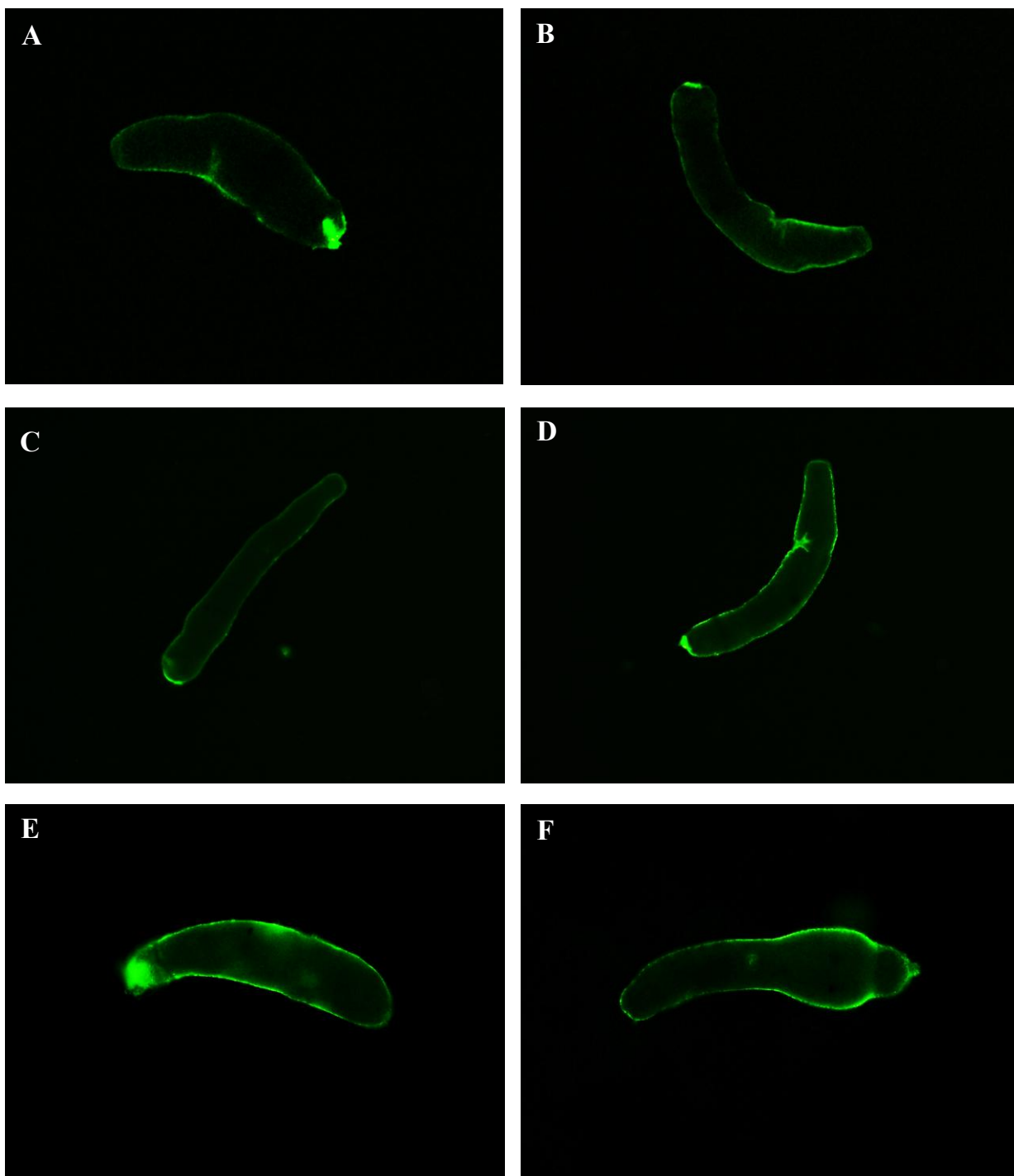
Man/Glc (Con A, LCA, PSA) a GalNAc (GSL-I, PNA). S předchozími experimenty (Blažová a Horák 2005), které se s naší prací shodují ve vazbě 5 lektinů, byl rozdíl ve vazbě lektinu GSL-I na povrch 3 denních schistosomul. V našich experimentech došlo k navázání lektinu se střední až slabou fluorescencí, naproti tomu Blažová a Horák (2005) neprokázali navázání tohoto lektinu na povrch těchto schistosomul. Vazba některých lektinů na povrch různě starých schistosomul je ukázána na obrázku 11 (A – F).

V případě lektinů se specifitou k GalNAc dochází u cercárií a schistosomul (všech tří námi testovaných kategorií) k vazbě jiných lektinů. U cercárií jsou to lektiny JAC a RCA-I, u schistosomul lektiny PNA, SBA, HPA, popř. GSL-I.

Pro snazší hodnocení výsledků a hledání markerů transformace byly lektiny s velmi slabou vazbou (hodnoceno +/-) na povrch schistosomul řazeny k reakci podobné jako u lektinů, které se nenavázaly na povrch larválních stádií (hodnoceno -). Lektiny WGA (specifita k GlcNAc) a JAC (širokospektrá specifita, řazen mezi lektiny se specifitou ke GalNAc) se vázaly na povrch všech námi testovaných schistosomul nespecificky (u těchto lektinů se nezdařila inhibice sacharidovým inhibitorem).

V tabulce 6 je patrné, jak se u jednotlivých stádií *T. regenti* mění vazba některých lektinů. Změna vazby lektinů odráží odlišnou glykosylaci povrchu cercárií a schistosomul. Lektiny UEA-I a LTA jsou dobrými markery transformace, protože se nevážou, nebo jen velmi slabě vážou, na povrch schistosomul. Dále do této kategorie byl zařazen i lektin PNA, který se naopak neváže na povrch cercárie, ale váže se na povrch schistosomula. Podobný fenomén byl také pozorován u lektinů HPA a SBA, ale jejich vazba na povrch schistosomul byla nižší intenzity.

Tato studie změn glykosylace povrchu schistosom nám pomohla vybrat nejvhodnější lektiny pro další experimenty (např. studující vliv některých peptidáz na odvrhování glykokalyxu).



Obr. 11 A – F: Charakterizace sacharidových epitopů různě starých schistosomul *T. regenti* pomocí fluorescenčně značených lektinů. **A:** 1,5 hodiny po transformaci *in vivo*, lektin HPA. **B:** 1,5 hodiny po transformaci *in vivo*, lektin PNA. **C:** 1 den po transformaci *in vitro*, lektin HPA. **D:** 1 den po transformaci *in vitro*, lektin LCA. **E:** 3 dny po transformaci *in vivo*, lektin PSA. **F:** 3 dny po transformaci *in vivo*, lektin LCA. **A – F:** zvětšení: 100x.

Tab. 6: Porovnání glykosylace povrchu cercárií a různě starých schistosomul *T. regenti*.

LEKTIN (c = 20 μg/ml)	VAZBA NA CERKÁRIE	VAZBA NA 1,5 HOD. SCHIST. (ex vivo)	VAZBA NA 1 DEN. SCHIST. (in vitro)	VAZBA NA 3 DEN. SCHIST. (ex vivo)
UEA-I	++	-, některé ½ těla - a ½ těla +	+-	-
LTA	++	-	+- až -	+-, některé -
Con A	++	+	+- až -	+, (+)
LCA	++	+	+	+
PSA	++	+	(+)	+
STA	-	+- až -	+- až -	-, některé +-
WGA	+/-	++*	++*	++*
SBA	-	+-, +	+	+-
GSL-I	-(+) ¹	-	-	+, (+)
PNA	-	++	++	+
RCA-I	(+)*/+ ²	+-, -	-	+-
JAC	++	++*	++*	++*
HPA	-	+-; +	+	+-

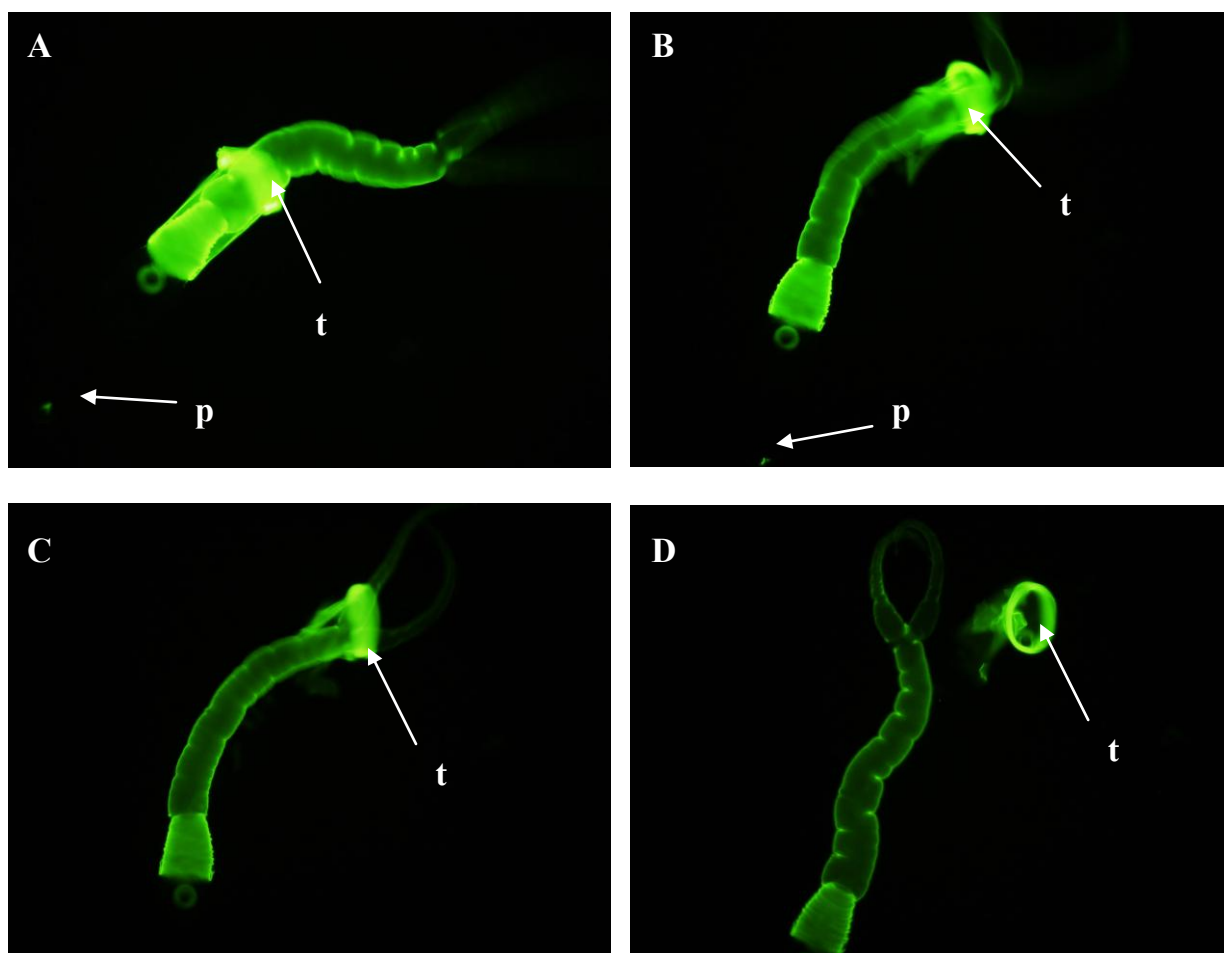
Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, +- velmi slabá fluorescence, - bez fluorescence, ● lektiny se specifitou k Fuc, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se specifitou k Gal/GalNAc, * nespecifická reakce.

Citace: ¹ Blažová a Horák (2005), ² Podhorský a kol. (2009).

4.3 Role lektinů při indukci vyprazdňování penetračních žláz a při stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti* in vitro

Experimenty se 13 lektiny bez přítomnosti kyseliny linolové jako stimulantu se nám podařilo dokázat, že téměř všechny tyto lektiny ve 3 použitých koncentracích (20 μg/ml, 10 μg/ml a 1 μg/ml) indukují vyprazdňování penetračních žláz v různé míře (viz tab. 7, 8 a 9). K sekreci obsahu penetračních žláz nedochází jen u lektinů STA a HPA v koncentraci 1 μg/ml (viz tab. 9). Intenzita vyprazdňování penetračních žláz je ukázána v tabulkách 7 – 9. Se snižující se koncentrací lektinů dochází v určitých případech ke snížení množství sekretovaného obsahu penetračních žláz. U většiny lektinů v koncentraci 1 μg/ml nebyla detekována fluorescence na povrchu cercárií (viz tab. 9). Na sekrety penetračních žláz se vážou tyto lektiny ve všech námi testovaných koncentracích, absence vazby na sekretech byla pouze v případě lektinů STA a HPA v koncentraci 1 μg/ml.

In vitro stimulace odvrhování glykokalyxu u cercárií je indukována 6 lektiny v koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ a 5 lektiny v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Při vyšší koncentraci se jedná o lektiny UEA-I, LTA, Con A, LCA, SBA a JAC. Při nižší koncentraci se jedná o stejné lektiny s výjimkou lektinu LCA. Při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ nedochází ke stimulaci odvrhování glykokalyxu (shrnutí v tab. 7 – 9). Mezi lektiny s nejvýraznější schopností *in vitro* stimulace odvrhování glykokalyxu patří lektiny se specifitou k Fuc (UEA-I a LTA) a lektin JAC. Obr. 12 dokumentuje odvrhování glykokalyxu způsobené lektinem JAC, kde na předním konci cercárie už není přítomen glykokalyx, ale je odvrhován v podobě kondenzovaného kroužku.



Obr. 12 A – D: *In vitro* stimulace postupného odvrhování glykokalyxu u cercárie *T. regenti* lektinem JAC. **p** přední konec těla cercárie, **t** odvržený glykokalyx a obsah penetračních žláz v podobě kondenzovaného kroužku, zvětšení: 100x.

Tab. 7: *In vitro* indukce vyprazdňování penetračních žláz a *in vitro* stimulace odvrhování glykokalyxu u cercárií pomocí fluorescenčně značených lektinů v koncentraci 20 µg/ml.

LEKTIN (c = 20 µg/ml)	VAZBA NA POVRCH CERKÁRIE (tělo/ocásek)	VAZBA NA SEKRETY	INDUKCE SEKRECE ŽLÁZ	TVORBA TUNELU
UEA-I	++	++	4	ANO (4)
LTA	++	++	4	ANO (4)
Con A	++	++	3	ANO (1)
LCA	++	++	4	ANO (1)
PSA	++	++	4	NE
STA	-	++	2	NE
WGA	+/-	++	3	NE
SBA	-	++	4	ANO (1)
GSL-I	-	++	4	NE
PNA	-	++	4	NE
RCA-I	(+)*	++	3	NE
JAC	++	++	3	ANO (4)
HPA	-	++	2	NE

Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, ● lektiny se specifitou k Fuc, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se specifitou k Gal/GalNAc, * nespecifická reakce, 1 – nejméně až 5 – nejvíce (Hodnocení číselnou stupnicí 1 – 5 reprezentuje v případě indukce sekrece žláz množství sekretů adherovaných na podložním sklíčku. U odvrhování glykokalyxu tato stupnice odráží množství jedinců, u kterých k tomuto procesu docházelo. 1 reprezentuje nejnižší intenzitu sekrece žláz a malý počet jedinců odvrhujících glykokalyx, 5 představuje opak. Počet takových jedinců byl vždy zohledněn na celkový počet pozorovaných jedinců. Odhazování ocásku bylo hodnoceno stejně jako odvrhování glykokalyxu. Ve všech případech docházelo k vzájemnému porovnávání sledovaného fenoménu a následně k hodnocení subjektivní číselnou stupnicí).

Tab. 8: *In vitro* indukce vyprazdňování penetračních žláz a *in vitro* stimulace odvrhování glykokalyxu u cerkárií pomocí fluorescenčně značených lektinů v koncentraci 10 µg/ml.

LEKTIN (c = 10 µg/ml)	VAZBA NA POVRCH CERKÁRIE (tělo/ocásek)	VAZBA NA SEKRETY	INDUKCE SEKRECE ŽLÁZ	TVORBA TUNELU
UEA-I	++	++	4	ANO (4)
LTA	++	++	4	ANO (3)
Con A	++	++	3	ANO (1)
LCA	++	++	3	NE
PSA	++	++	4	NE
STA	-	++	1	NE
WGA	+/-	++	3	NE
SBA	-	++	4	ANO (1)
GSL-I	-	++	4	NE
PNA	-	++	4	NE
RCA-I	(+)*	++	3	NE
JAC	++	++	3	ANO (3)
HPA	-	++	1	NE

Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, ● lektiny se specifitou k Fuc, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se specifitou k Gal/GalNAc, * nespecifická reakce, 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7).

Tab. 9: *In vitro* indukce vyprazdňování penetračních žláz a *in vitro* stimulace odvrhování glykokalyxu u cercárií pomocí fluorescenčně značených lektinů v koncentraci 1 µg/ml.

LEKTIN (c = 1 µg/ml)	VAZBA NA POVRCH CERKÁRIE (tělo/ocásek)	VAZBA NA SEKRETY	INDUKCE SEKRECE ŽLÁZ	TVORBA TUNELU
UEA-I	+	++	4	NE
LTA	-	++	2	NE
Con A	-	++	2	NE
LCA	-	++	1	NE
PSA	-	++	1	NE
STA	-	-	X	NE
WGA	+/-	++	2	NE
SBA	-	++	3	NE
GSL-I	-	++	3	NE
PNA	-	++	2	NE
RCA-I	-	++	1	NE
JAC	(+)*	++	1	NE
HPA	-	-	X	NE

Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, ● lektiny se specifitou k Fuc, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se specifitou k Gal/GalNAc, * nespecifická reakce, 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7), X neindukuje vyprazdňování penetračních žláz.

4.4 Vliv sacharidových inhibitorů lektinů na indukci vyprazdňování penetračních žláz a stimulaci odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti* *in vitro*

Kombinace různých lektinů se specifickými sacharidovými inhibitory nebo neinhibujícími sacharidy nám pomohly zjistit, jakým způsobem jsou procesy stimulace odvrhování glykokalyxu a indukce vyprazdňování penetračních žláz vyvolávány lektiny.

Experimenty se specifickými sacharidovými inhibitory ukázaly, že ve většině případů nedochází k navázání lektinů na povrch cercárií. Výjimkou byl jen lektin RCA-I, který nebyl zainhibován ani jedním ze svých sacharidů (laktosa, Gal/GalNAc). I přes zainhibování vazby lektinů na povrch stále docházelo k jisté indukci vyprazdňování penetračních žláz cercárií a k nespecifické vazbě lektinů na tyto produkty (s výjimkou lektinu STA). U některých cercárií

docházelo po inhibici ke snížení intenzity vyprazdňování penetračních žláz (viz porovnání tab. 7 a 10). K výraznému poklesu došlo např. u lektinů LCA, STA a WGA. Samotné sacharidové inhibitory neidukují vyprazdňování penetračních žláz.

Při použití specifických sacharidových inhibitorů u žádného z testovaných lektinů nedochází k odvrhování glykokalyxu (viz tab. 10 a 11). Tabulka 11 ukazuje, že po inkubaci cerkárií se směsí lektinů stimulujících odvrhování glykokalyxu cerkárií s jejich specifickými sacharidovými inhibitory a následnému přidání lektinu jiné sacharidové specifity (PSA, WGA) než námi testované lektiny, došlo k plnému navázání na povrch cerkárií ve stejné intenzitě, jak je uvedeno v tabulce 5, ale nedošlo k odvrhování glykokalyxu (tvorbě tunelu).

Tab. 10: Experimenty s lektiny a jejich specifickými sacharidovými inhibitory – ovlivnění vazby lektinů na povrch, na sekrety penetračních žláz, ovlivnění indukce sekrece žláz a stimulace odvrhování glykokalyxu.

LEKTIN	INHIBITOR	VAZBA NA T/O	VAZBA NA S PŽ	INDUKCE SEKRECE PŽ	TVORBA TUNELU
UEA-I	Fuc	-	++	4	NE
LTA	Fuc	-	++	4	NE
Con A	MetMan/MetGlc	-	++	3	NE
LCA	MetMan/MetGlc	-	++	2-3	NE
PSA	MetMan/MetGlc	-	++	3-4	NE
STA	GlcNAc	-	-	X	NE
WGA	GlcNAc	-	++	2	NE
SBA	Gal/GalNAc	-	++	4	NE
GSL-I	Gal/GalNAc	-	++	4	NE
PNA	Gal/GalNAc	-	++	4	NE
RCA-I	Gal/GalNAc	(+)	++	4	NE
RCA-I	Lac	(+)	++	3	NE
JAC	Gal/GalNAc	-	++	3	NE
JAC	Mel	-	++	3	NE
HPA	Gal/GalNAc	-	++	2	NE

Vysvětlivky: ● lektiny se specifitou k Fuc, Fuc inhibitor, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, MetMan/MetGlc inhibitor, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, GlcNAc inhibitor, ● lektiny se se specifitou k Gal/GalNAc, Gal/GalNAc inhibitor, ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, T/O tělo/ocásek, S sekrety, PŽ penetrační žlázy, X neindukuje vyprazdňování penetračních žláz, 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7 v kapitole 4.3).

Tab. 11: Pozorování vlivu lektinů stimulujících odvrhování glykokalyxu s jejich specifickými sacharidovými inhibitory a následné hodnocení vazby přidávaného lektinu jiné sacharidové specifity na povrch cercárie, který nestimuluje odvrhování glykokalyxu.

LEKTIN stimulující odvrhování glykokalyxu + specifický inhibitor	LEKTIN nestimulující odvrhování glykokalyxu, vázající se na povrch těla cercárie (PSA, WGA)
UEA-I + Fuc SPŽ (2-3), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	PSA +
LTA + Fuc SPŽ (2-3), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	PSA +
Con A + MetMan/MetGlc SPŽ (3), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	WGA +
LCA + MetMan/MetGlc SPŽ (3), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	WGA +
SBA + GalNAc SPŽ (3-4), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	PSA +
JAC + Mel SPŽ (3), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	PSA +
JAC + GalNAc SPŽ (4), vazba na T/O -, vazba na SPŽ+	PSA +

Vysvětlivky: ● lektiny se specifitou k Fuc, Fuc inhibitor, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, MetMan/MetGlc inhibitor, ● lektiny se specifitou k GlcNAc, ● lektiny se se specifitou k Gal/GalNAc, Gal/GalNAc inhibitor, + pozitivní reakce, - bez reakce, T/O – tělo/ocásek, S sekrety, PŽ penetrační žlázy, SPŽ sekrece penetračních žláz, 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7 v kapitole 4.3).

Experimenty se sacharidy, pro které nemají dané lektiny vazebné preference (viz tab. 12), nám pomohlo odhalit, zda všeobecně volné sacharidy neinhibují odvrhování glykokalyxu. V tabulce 12 je shrnuto, jak byly jednotlivé lektiny (v koncentraci 20 µg/ml) inkubované se sacharidy, které neinhibují daný lektin. Následně byl sledován vliv těchto sacharidů na navázání lektinů na povrch cercárií a na stimulaci odvrhování glykokalyxu. Některé nespecifické kombinace poskytovaly shodné výsledky, ať už pozitivní nebo negativní (UEA-I a Gal/GalNAc, JAC a MetMan/MetGlc, LCA a Gal/GalNAc). U ostatních kombinací (viz tab. 12) nebyly výsledky konzistentní. V určitých případech docházelo k zainhibování odvrhování glykokalyxu. Naopak, při některých opakování experimentu za stejných podmínek k tomuto procesu nedocházelo. Vazba lektinů na povrch cercárií byla inhibována i neinhibujícími sacharidy, jako tomu bylo např. u lektinu LTA (viz tab. 12). V takových případech také častěji docházelo k zainhibování odvrhování glykokalyxu při opakovaných

experimentech. Na základě těchto výsledků lze usuzovat, že všeobecně volné sacharidy neinhibují odvrhování glykokalyxu.

Tab. 12: Lektiny stimulující odvrhování glykokalyxu u cercárií a testované kombinace neinhibujících sacharidů.

LEKTIN	INHIBITOR	VAZBA NA POVRCH	TVORBA TUNELU
UEA-I	X	++	A
UEA-I	MetMan/MetGlc	(+)	N, A, N, A
UEA-I	Gal/GalNAc	++	A, A, †
LTA	X	++	A
LTA	MetMan/MetGlc	-	A, N, N, N, N
LTA	Gal/GalNAc	-	N, A, N, N
ConA	X	++	A
ConA	Fuc	+	A, N, N, A
ConA	Gal/GalNAc	+	A, N, N, A
LCA	X	+	A
LCA	Fuc	(+)	A, N, N, A, N
LCA	Gal/GalNAc	-	N, N, N
SBA	X	-	A
SBA	Fuc	-	N, A, N
SBA	MetMan/MetGlc	-	N, A, N
JAC	X	++	A
JAC	Fuc	++	A, N, A, N, A
JAC	MetMan/MetGlc	++	N, N, N

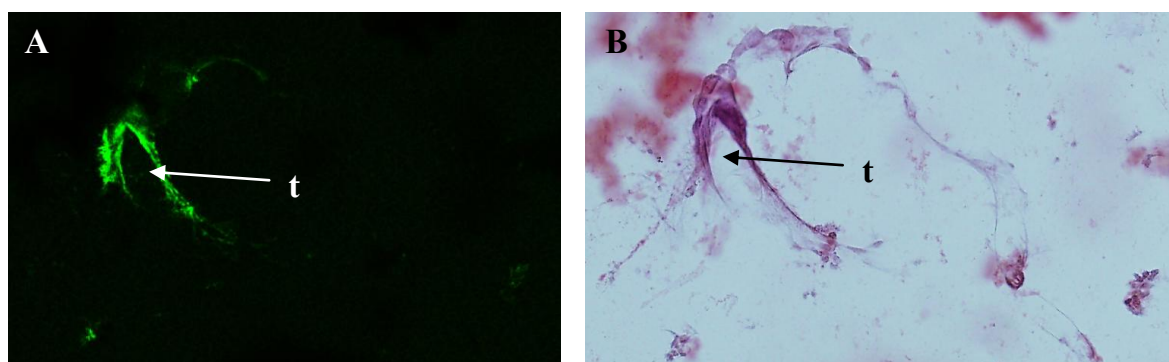
Vysvětlivky: ++ silná fluorescence, + střední fluorescence, (+) slabá fluorescence, - bez fluorescence, ● lektiny se specifitou k Fuc, Fuc inhibitor, ● lektiny se specifitou k MetMan/MetGlc, MetMan/MetGlc inhibitor, ● lektiny se se specifitou k Gal/GalNAc, Gal/GalNAc inhibitor, X – testováno bez inhibitoru (kontrola), A ano, N ne, † smrt.

4.5 Vazba lektinů, alizarinu a lithium karmínu na sekrety penetračních žláz cercárií

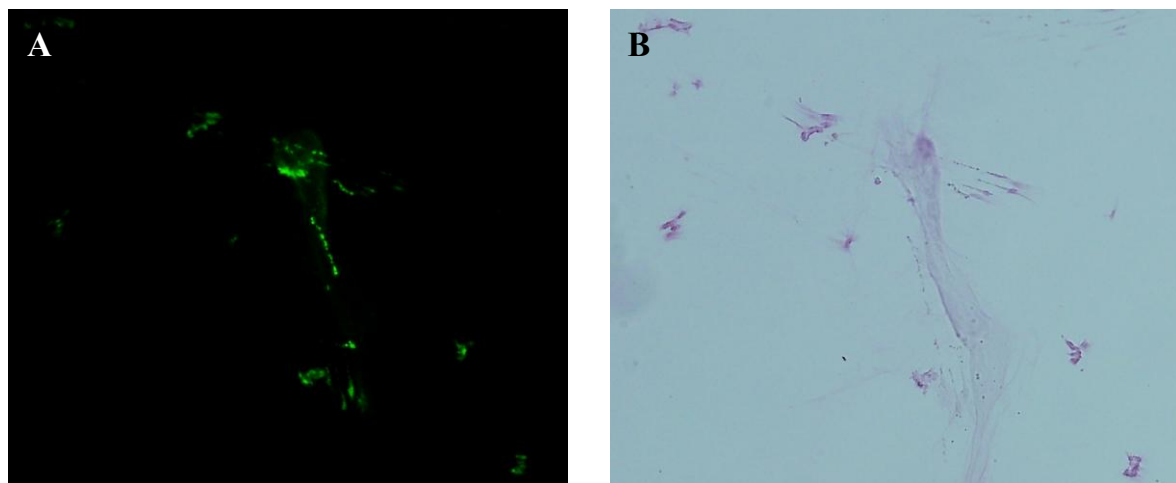
Společné inkubace lektinů s lithium karmínem nebo alizarinem ukázaly, že se tyto látky vážou na stejné sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti*. Obrázek 13 ukazuje vazbu lektinů UEA-I, LTA, PSA a LCA v kombinaci s alizarinem. V případě navázání lektinu a následném přidání alizarinu docházelo ke snížení intenzity fluorescence. Na sekrety vyprázdňené z penetračních žláz až po přidání alizarinu se přednostně vázal právě alizarin, nebyla patrná

fluorescence lektinu. Patrně docházelo k jejímu přehlušení alizarinem, důvodem mohla být změna podmínek, např. v pH, které tuto reakci zapříčinila.

Obrázek 14 dokumentuje vazbu lithium karmínu v kombinaci s lektiny (UEA-I, LTA , PSA a LCA). Problémy s vazbou lektinů byly stejné jako v případě alizarinu. Výsledky se shodují v obou testovaných postupech, jak bylo zmíněno v kapitole 3.8.6. Tyto výsledky potvrzují, že v průběhu sekrece obsahu penetračních žláz a odvrhování glykokalyxu jsou tyto sekrety smíchané a dochází tedy k jejich simuntánní sekreci.



Obr. 13 A – F: Společné značení sekretů penetračních žláz alizarinem a lektiny, dvojice fotografií ze světelného a fluorescenčního mikroskopu: A – B, C – D, zvětšení: 100x. t odvržený glykokalyx a obsah penetračních žláz v podobě tunelu.

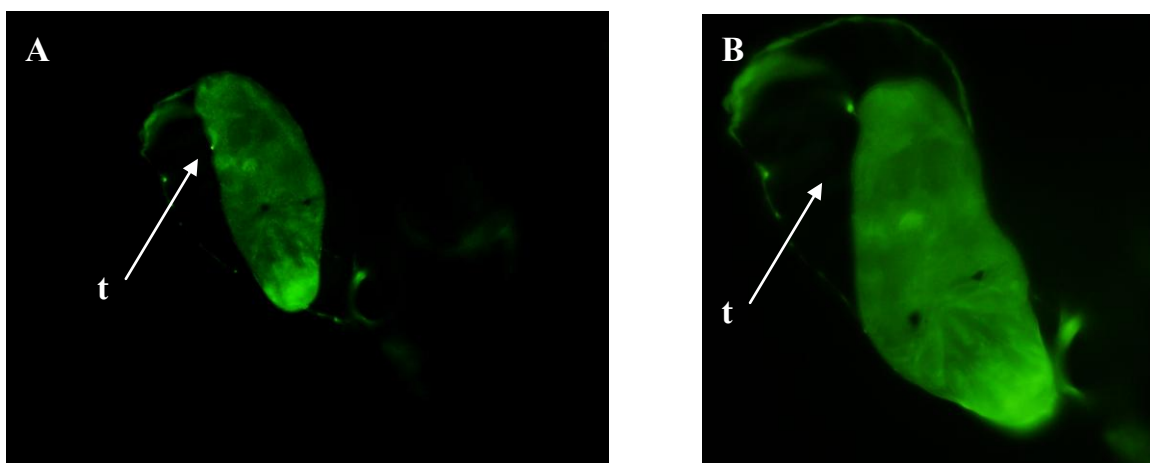


Obr. 14 A – B: Společné značení sekretů penetračních žláz lithium karmínem a lektiny, A – B: dvojice fotografií ze fluorescenčního a světelného mikroskopu, zvětšení: 100x.

4.6 Vazba CFSE na povrch a sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti*

20 μ M CFSE se po 1,5 hodinové inkubaci vázal na povrch cercárií a na sekrety z penetračních žláz cercárií. Vazba na povrch byla demonstrována silnou fluorescencí (++, stejné hodnocení jako u hodnocení síly vazby lektinů, viz např. kapitola 4.2.2) a vazba na sekrety fluorescencí střední (+). Samotné CFSE po 1,5 hodinové inkubaci u některých jedinců neovlivňovalo chování cercárií, ale u jiných cercárií docházelo ke změnám běžného fyziologického stavu. V takových případech cercárie odhazovaly ocásky nebo byly pozorovány křečovitě pohyby ocásku. Nebyla prokázána indukce vyprazdňování penetračních žláz samotným CFSE.

Po následné inkubaci s kyselinou linolovou docházelo k sekreci obsahu penetračních žláz a navázání tohoto obsahu na celý povrch cercárií. Stejně jako v případě experimentů s lektiny (viz kapitola 4.2.2) docházelo k postupnému prolézání obsahem žláz za pomoci penetračních pohybů, ale na rozdíl od experimentů s lektiny nedocházelo ke ztrátě fluorescence povrchu cercárií. I v tomto případě za sebou cercárie zanechávaly tunel z obsahu penetračních žláz (viz obr. 15).



Obr. 15 A, B: Vazba CFSE na povrch a sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti*. **t** tunel ze sekretů penetračních žláz, zvětšení: A: 100x, B: 200x.

4.7 Vliv rekombinantní formy katepsinu B2 na odvrhování glykokalyxu u cercárií *Trichobilharzia regenti*

Po inkubaci cercárií s rekombinantní formou katepsinu B2 v různých koncentracích se jako nejvhodnější pro experimenty s odvrhováním glykokalyxu ukázala koncentrace 0,01 μ g/ μ l, která nejméně ovlivňovala chování cercárií (např. sekreci obsahu penetračních žláz, více viz

tab. 13). V této koncentraci dochází jen k nepatrné indukci vyprazdňování obsahu penetračních žláz, a proto byla tato koncentrace dále používána při experimentech s indukcí odvrhování glykokalyxu u cercárií *Trichobilharzia regenti*. Ostatní koncentrace se ukázaly být méně vhodné, ať už svým vlivem na chování cercárií anebo tím, že zvolená koncentrace byla příliš nízká a její podíl na odvrhování glykokalyxu teoreticky nemusel být dostačující. Srovnání chování cercárií po inkubaci s vybranými koncentracemi katepsinu CB2 je shrnuto v tabulce 13.

Tab. 13: Testované koncentrace katepsinu CB2 a jejich vliv na chování cercárií.

Koncentrace katepsinu CB2 (µg/µl)	Chování cercárií
0,1	Sekrece obsahu penetračních žláz (5), smrt do 5 minut
0,05	Sekrece obsahu penetračních žláz (5), smrt do 10 minut
0,02	Odhazování ocásku, sekrece obsahu penetračních žláz (3), žijí déle než 10 minut
0,015	Sekrece obsahu penetračních žláz (1), normální pohyblivost
0,01	Sekrece obsahu penetračních žláz (1), normální pohyblivost
0,025	Sekrece obsahu penetračních žláz (1), normální pohyblivost

Vysvětlivky: 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7 v kapitole 4.3)

Inkubace cercárií s rekombinantní formou katepsinu B2 a následné značení povrchu lektiny ukázalo, že i po této inkubaci dochází k úplné vazbě lektinu UEA-I na povrch cercárií, lektin PNA se nevázal. Tyto 2 lektiny slouží jako lektinové markery transformace, jak bylo zmíněno v kapitole 4.2.3. Reakce těchto lektinů byla shodná, jak u cercárií inkubovaných s katepsinem B2, tak u cercárií kontrolních, které nepřišly do kontaktu s touto peptidázou. Zdá se, že katepsin B2 nedegraduje lektin, protože nedošlo k narušení jeho vazby na povrch. Pouze v případě lektinu UEA-I po čase dochází k odvrhování glykokalyxu, ale to jen z důvodu, že samotný lektin UEA-I stimuluje odvrhování glykokalyxu (viz 4.3).

4.8 Vliv inhibitorů různých katalytických skupin peptidáz na odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*

Inkubace cercárií s různými inhibitory tří skupin peptidáz (cysteinových, serinových a metalopeptidáz – viz tab. 14) měla ukázat, zda některý z těchto inhibitorů inhibuje odvrhování glykokalyxu po indukci tohoto procesu kyselinou linolovou. Výsledek byl u všech testovaných inhibitorů velmi podobný (shrnutí v tab. 14). Po inkubaci cercárií s jednotlivými inhibitory a přidáním kyseliny linolové jako stimulu k vyprazdňování penetračních žláz docházelo ve všech případech k odvrhování glykokalyxu, odhazování ocásku a sekreci obsahu penetračních žláz. U kontrolních cercárií inkubovaných pouze s inhibitorem (bez stimulantu) nedocházelo k odvrhování glykokalyxu, vyprazdňování obsahu penetračních žláz probíhalo v malém množství.

Tab. 14: Vliv jednotlivých inhibitorů na odvrhování glykokalyxu po stimulaci kyselinou linolovou.

INHIBITOR	VLIV NA CEREKÁRIE		
	INDUKCE SEKRECE ŽLÁZ	ODHOZENÍ OCÁSKU	TVORBA TUNELU
Leupeptin	ANO (3)	ANO (2)	ANO (1)
Aprotinin	ANO (3)	ANO (2)	ANO (2)
TLCK	ANO (3-4)	ANO (1-2)	ANO (2)
E-64	ANO (4)	ANO (3)	ANO (2)
E-64d	ANO (4)	ANO (3)	ANO (2)
EDTA	ANO (4)	ANO (3)	ANO (2)
EGTA	ANO (4)	ANO (3)	ANO (2)

Vysvětlivky: 1 – nejméně až 5 – nejvíce (blíže viz tab. 7 v kapitole 4.3), ● inhibitory serinových peptidáz, ● inhibitory cysteinových peptidáz, ● inhibitory metalopeptidáz.

4.9 Lokalizace Lewis X antigenu na povrchu jednotlivých stádií *T. regenti*

Pomocí primární protilátky anti-CD15 (MEM 158 IgM) jsme lokalizovali Lewis X antigen na povrchu jednotlivých stádií ptačí schistosomy *T. regenti*. Experimenty s detekcí Le^x antigenu na povrchu probíhaly na cercáriích, dospělých, *in vitro* (1 a 3 denní) i *ex vivo* (1,5 hodinové, 1, 3, 5 a 7 denní) získaných schistosomulech (výsledky jsou shrnuty v tab. 15).

Oba typy námi použitých kontrol vyšly dle předpokladu – nedocházelo k reakci na povrchu jednotlivých stádií, proto se v případě navázání primární protilátky na určitá stadia,

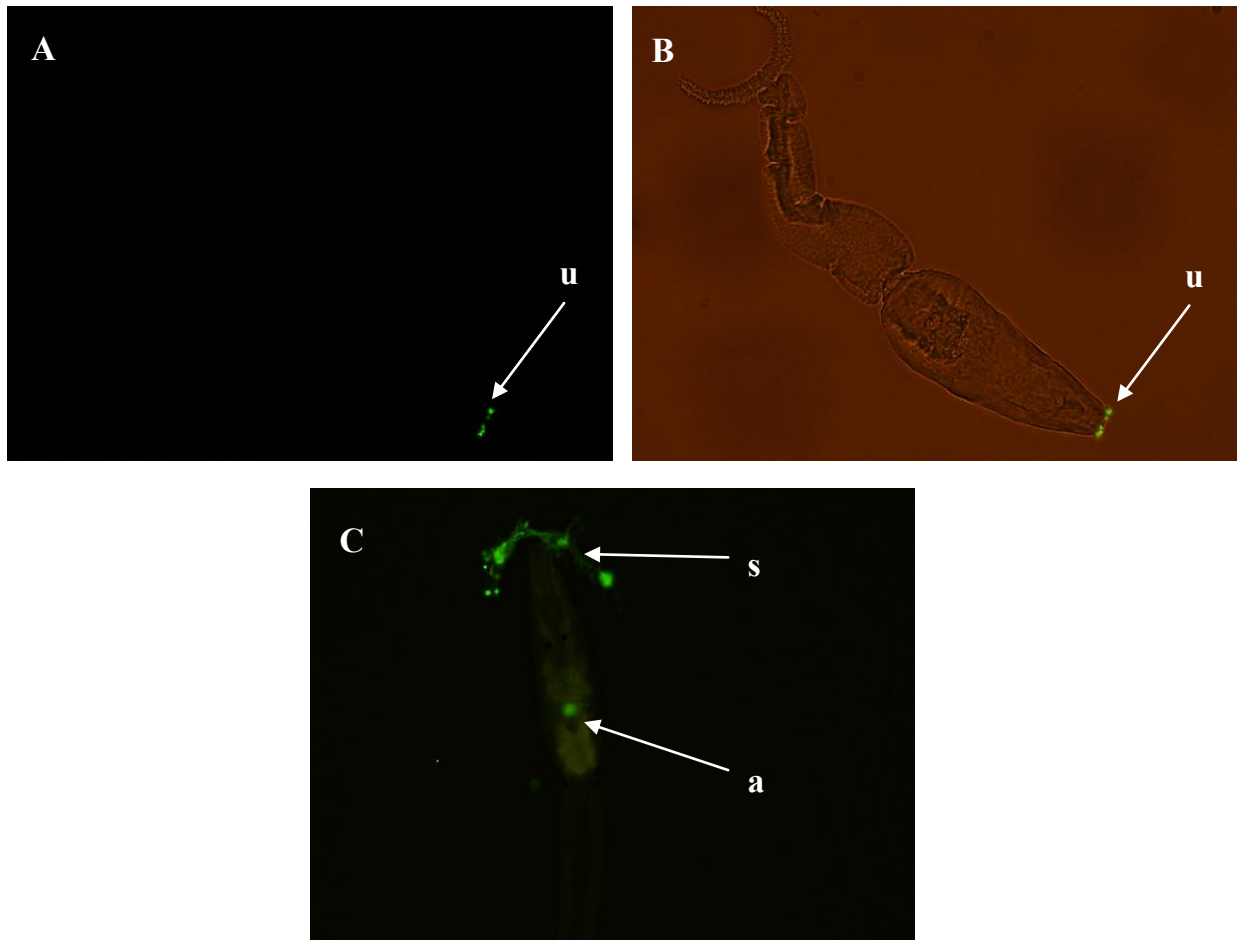
jednalo o specifickou reakci. Kontrolní experimenty s cercáriemi *Schistosoma mansoni* ukázaly, že se námi testovaná protilátka neváže na povrch, ale jen na apikální část hlavového orgánu (viz obr. 16A, B), popř. u některých jedinců na acetabulum. Schistosomula *S. mansoni* se nám prozatím nepodařilo získat.

Na povrchu cercárií *T. regenti* nedocházelo k vazbě primární protilátky proti Le^x antigenu, vázala se jen na sekrety penetračních žláz tohoto stádia (viz obr. 16C). Nenavázání protilátky na povrch bylo pozorováno také na povrchu 1,5 hodiny starých schistosomul získaných *ex vivo* a 1 denních schistosomul získaných *in vitro*. Zajímavý fenomén byl pozorován u 1 denních, 3 denních schistosomul získaných *ex vivo* a 3 denních schistosomul získaných *in vitro*. U těchto stádií byla pozorována vazba anti-CD15 protilátky jen na přední části těl schistosomul (viz tab. 15 a obr. 17, 18), popř. navázání této protilátky nastalo jen u některých jedinců stejného stáří. Vazba na celý povrch těla byla patrná u 5 denních a 7 denních schistosomul (obr. 19). Dospělci *T. regenti* nakonec nebyli na přítomnost Le^x antigenu testováni, protože jejich počet po nákaze a vypitvání kachen nebyl dostatečný pro tento experiment.

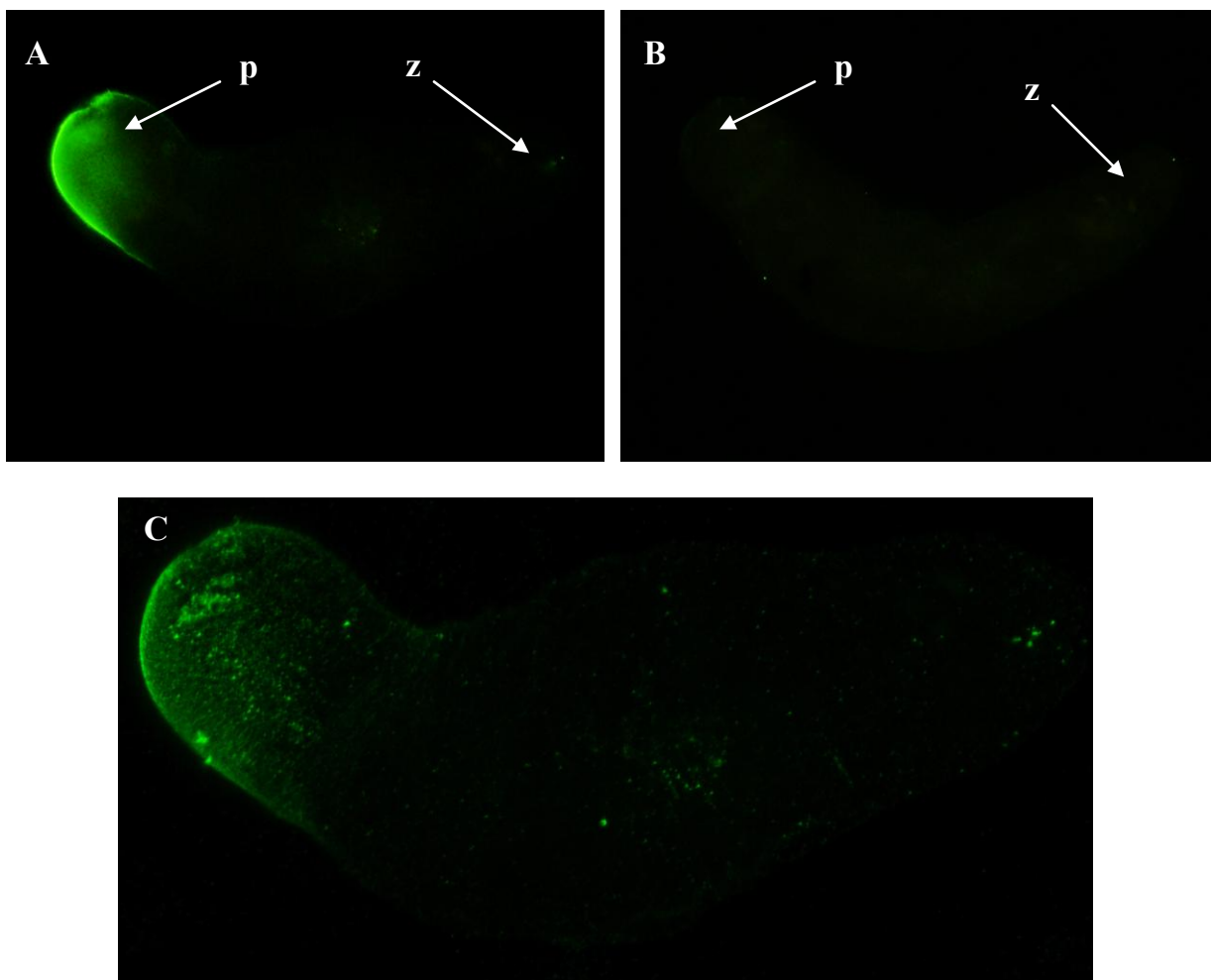
Tab. 15: Lokalizace Le^x antigenu na povrchu jednotlivých stádií *T. regenti* a *S. mansoni*.

Stádium	Vazba anti-CD15
cercárie <i>T. regenti</i>	- (vazba na S PŽ)
cercárie <i>S. mansoni</i>	- (vazba na UP a někdy na AC)
<i>T. regenti</i> - 1,5 hod. schistosomula <i>ex vivo</i>	-
<i>T. regenti</i> - 1 denní schistosomula <i>ex vivo</i>	¼ + (vazba jen na přední část těla), ¾ -
<i>T. regenti</i> - 3 denní schistosomula <i>ex vivo</i>	+ (vazba jen na přední část těla)
<i>T. regenti</i> - 5 denní schistosomula <i>ex vivo</i>	+
<i>T. regenti</i> - 7 denní schistosomula <i>ex vivo</i>	+
<i>T. regenti</i> dospělci	0
<i>T. regenti</i> - 1 den. schistosomula <i>in vitro</i>	-
<i>T. regenti</i> - 3 den. schistosomula <i>in vitro</i>	¾ + (vazba jen na přední část těla), ¼ -

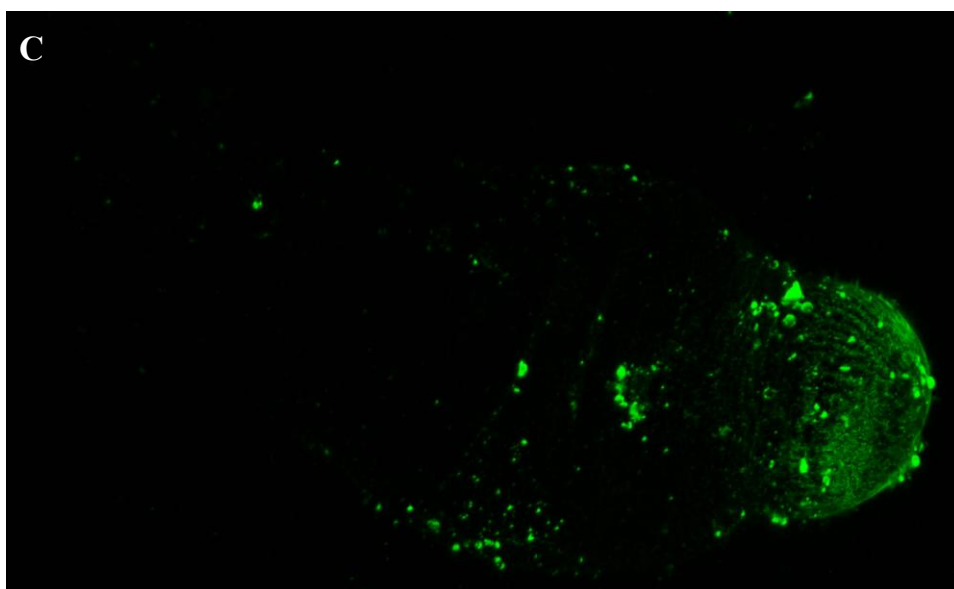
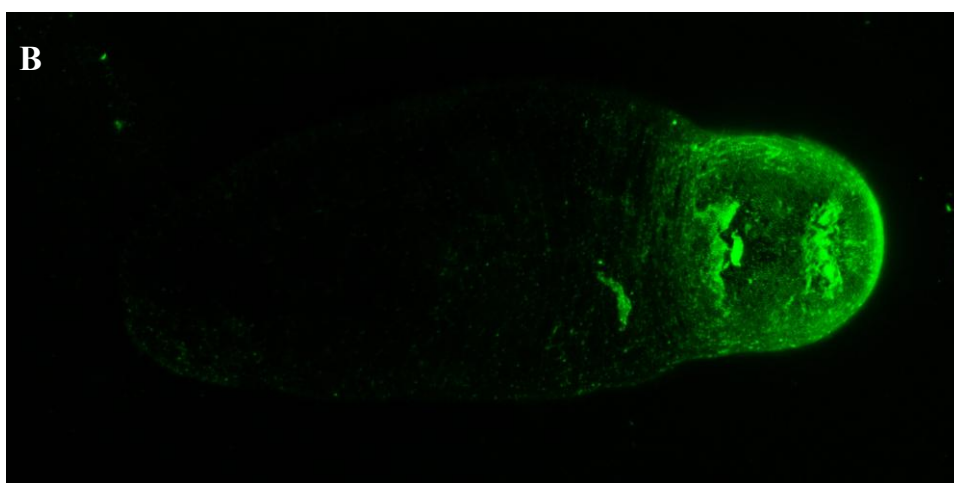
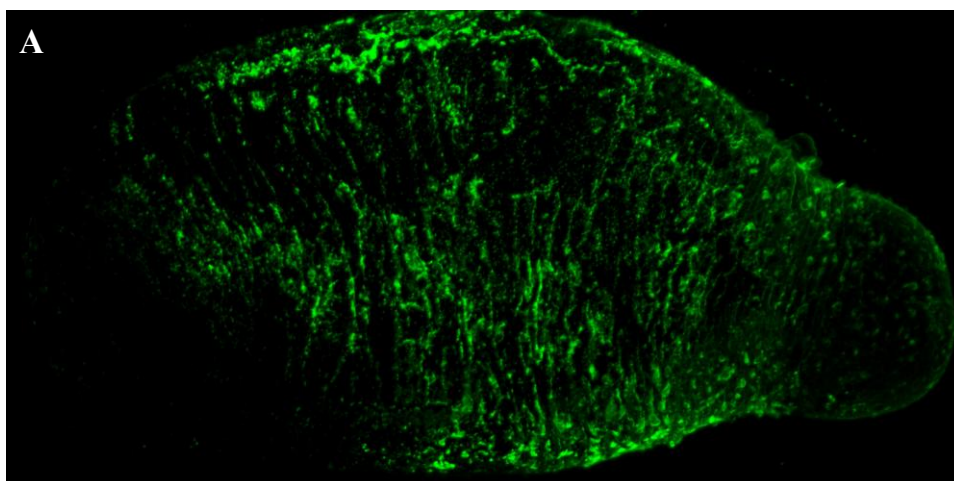
Vysvětlivky: + pozitivní reakce, - bez reakce, 0 netestováno, UP ústní přísavka, AC acetabulum, S sekrety, PŽ penetrační žlázy.



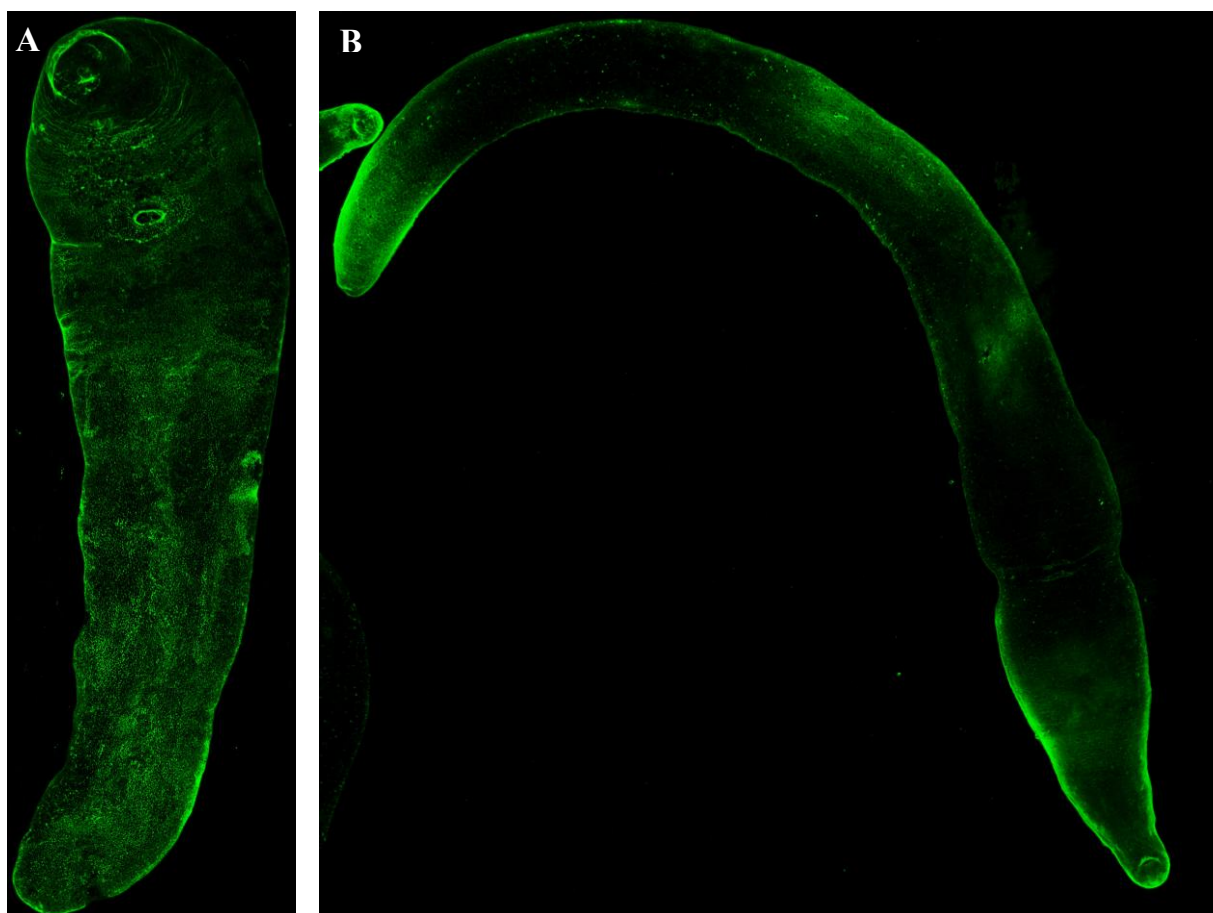
Obr. 16 A – C: Lokalizace Le^x antigenu na povrchu cercárií schistosom. **A:** Vazba primární protilátky na apikální část hlavového orgánu cercárie *S. mansoni*. **B:** Korespondující fotografie ze světelného mikroskopu. **C:** Vazba na sekrety penetračních žláz cercárie *T. regenti*. **a** acetabulum, **s** sekrety penetračních žláz cercárie, **u** ústní přísavka cercárie, **A, B:** zvětšení: 100x, **C:** zvětšení: 40x.



Obr. 17 A – C: Lokalizace Le^x antigenu na povrchu 1 denních schistosomul získaných po *in vivo* transformaci. **A:** Vazba primární protilátky na anteriorní konec těla. **B:** Stejně staré schistosomulum, nedochází k vazbě na její povrch. **A, B:** zvětšení: 100x. **C:** Fotografie z konfokálního mikroskopu, vazba na anteriorní část těla, zvětšení: 200x. **p** přední konec těla schistosomula, **z** zadní konec těla schistosomula.



Obr. 18 A – C: Lokalizace Le^x antigenu na povrchu 3 denních schistosmul, fotografie z konfokálního mikroskopu, zvětšení: 200x. **A, B:** *In vivo* transformovaná schistosomula – lišící se plochou těla, kde je exprimovaný Le^x antigen. **C:** *In vitro* transformované schistosomulum.

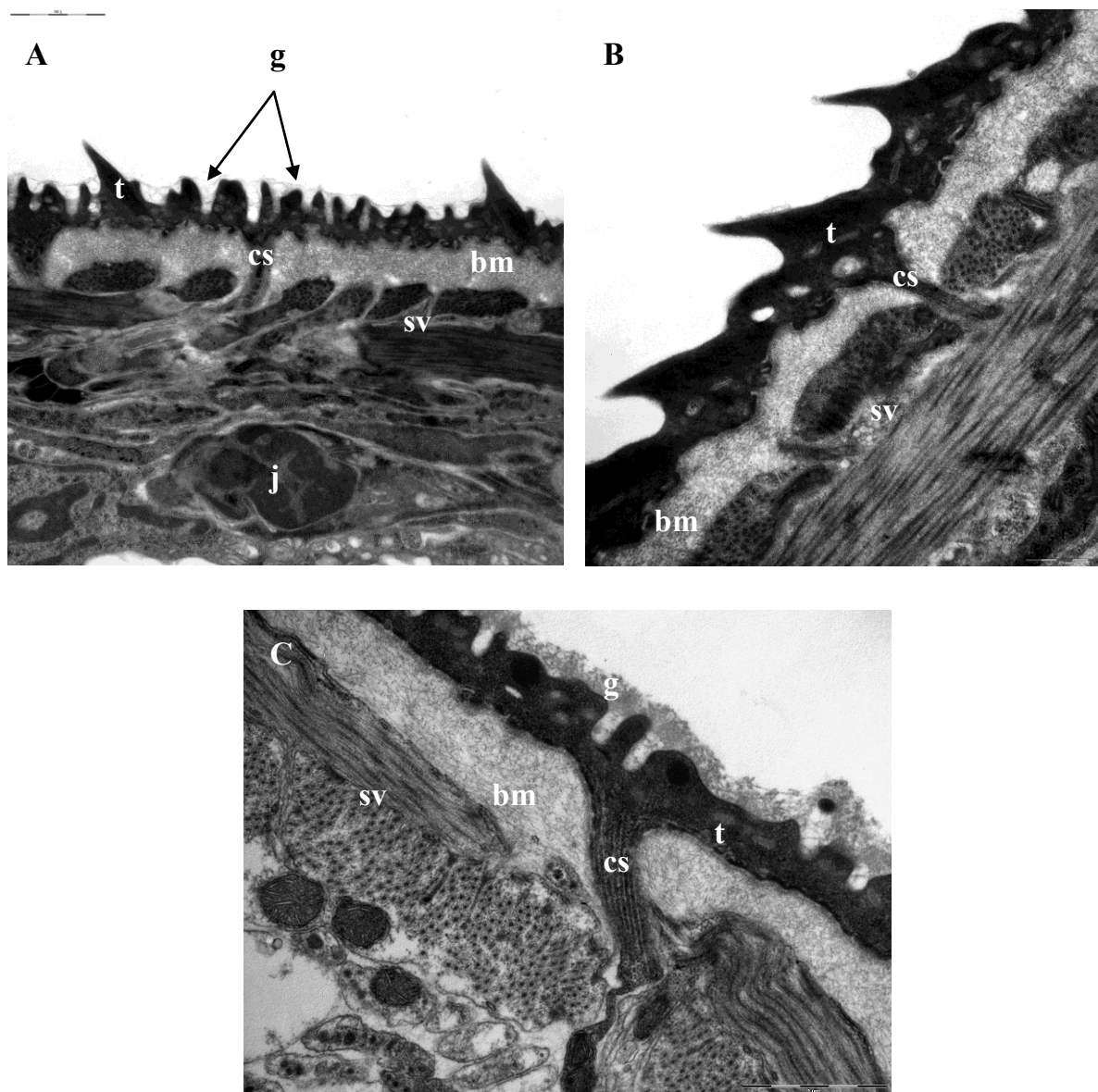


Obr. 19 A: Lokalizace Le^x antigenu na povrchu 5 denního schistosomula. **B:** Lokalizace Le^x antigenu na povrchu 7 denního schistosomula. **A, B:** fotografie z konfokálního mikroskopu, zvětšení: 200x.

4.10 Studium odvrhování glykokalyxu pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM)

Hodnocení změn v povrchu schistosomul *T. regenti* získaných brzy po *in vivo* transformaci, kterou prodělaly během penetrace kůže kachny domácí, probíhalo pomocí TEM.

Z výsledků je patrné (viz. obr. 20A a 20B), že většina glykokalyxu je ztracena v průběhu penetrace kůže hostitele. Při experimentech se schistosomuly ze stejné várky byly pozorovány 2 odlišné fenomény. První je zdokumentován na obr. 20A, kde je viditelná ztenčená vrstva glykokalyxu, která má jiné ultrastrukturální složení oproti glykokalyxu na povrchu cercárií (pro porovnání je uveden obr. 20C, kde je povrch cercárie s ještě silnou vrstvou glykokalyxu). Druhý fenomén je ukázán na obr. 20B, kde na povrchu schistosomula není patrný glykokalyx. Už takto brzy po transformaci je také patrná tvorba dvojité membrány tegumentu (fotografie není přiložena).



Obr. 20: A – C: Povrch cercárie a schistosomula *T. regenti*. **A:** Povrch schistosomula brzy po transformaci, ztenčená vrstva glykokalyxu. Měřítko je 1 μm . **B:** Povrch schistosomula *T. regenti* brzy po transformaci, glykokalyx již není patrný. Měřítko je 0,5 μm . **C:** Povrch cercárie, foto: Jana Bulantová. Měřítko je 1 μm . **bm** bazální membrána, **cs** cytoplazmatický spoj, **g** glykokalyx, **j** jádro subtegumentální buňky, **sv** podpovrchová svalovina, **t** tegument.

5 Diskuse

5.1 Charakterizace změn v glykosylaci povrchu cercárií *T. regenti* při transformaci na schistosomula

Vazbou fluorescenčně značených lektinů na různě stará schistosomula *T. regenti* jsme charakterizovali sacharidové epitopy na jejich povrchu. Díky tomu jsme byli schopni porovnat sacharidové profily glykokalyxu cercárií a schistosomul *T. regenti*, což nám umožnilo sledovat změny v glykosylaci povrchu cercárií při transformaci na schistosomula a určit tak markery transformace. Výrazné změny byly zaznamenány ve výskytu Fuc na povrchu *T. regenti*. Lektiny se specifitou k Fuc (UEA-I, LTA) se vyskytovaly na povrchu cercárií, ale u 1,5 hodinových schistosomul docházelo k výrazné redukci této vazby. U starších schistosomul již k vazbě těchto lektinů nedocházelo vůbec. Redukce fukosylovaných epitopů byla prokázána také u *S. mansoni*. Imunolokalizace monoklonálními protilátkami proti těmto epitopům z O-glykanů glykokalyxu cercárií *S. mansoni* odhalila přítomnost Fuc reziduí na povrchu cercárií a nově transformovaných schistosomul, ale ne na povrchu dospělců schistosom (Köster a Strand 1994).

Absence fukosylovaných epitopů nebyla pozorována na povrchu 5 hodinových *in vitro* transformovaných schistosomul *T. szidati*, jak dokumentuje Horák (1995) a Horák a kol. (1998b). Jinak tomu bylo u *in vivo* transformovaných schistosomul *T. szidati* u nespecifického myšího hostitele, kde docházelo k naprosté redukci těchto epitopů již 5 hodin po penetraci. U specifického definitivního hostitele (kachny) docházelo na povrchu k redukci těchto epitopů 12 hodin po penetraci. Pětidenní schistosomula téhož druhu fukosylované epitopy na svém povrchu nemají (Horák a kol. 1998b). Tyto výsledky naznačují, že na povrchu schistosom dochází v průběhu transformace k redukci množství fukosylovaných epitopů a je pravděpodobné, že tomu tak bude i u dalších druhů těchto parazitů.

Kromě změny ve vazbě lektinů se specifitou k Fuc byly pozorovány rozdíly ve vazbě lektinů se specifitou ke Gal a GalNAc. Konkrétně se jednalo o lektiny PNA, SBA a HPA, které se nevázaly na povrch cercárií *T. regenti*, ale na povrch schistosomul ano. U *T. szidati* byl pozorován stejný jev jen v případě lektinu PNA (Horák 1995, Horák a kol. 1998b). Na základě našich výsledků byly jako markery transformace u *T. regenti* vybrány lektiny UEA-I, LTA a PNA. Vazba lektinů se specifitou k Man/Glc zůstává stále stejná, liší se jen v intenzitě fluorescence. U lektinů se specifitou ke GlcNAc došlo ke změně u lektinu WGA, který se vázal na povrch cercárií, ale jeho vazba na povrch schistosomul byla zřejmě nespecifická,

nepodařilo se zabránit vazbě lektinu zainhibováním sacharidovým inhibitorem.

Horák a kol. (1998b) nepozorovali v rozporu s našimi výsledky u 3 denních schistosomul *T. szidati* v nespecifickém hostiteli vůbec žádnou vazbu lektinů na tato stádia. Situace je možná způsobena vývojem v nespecifickém hostiteli, jak je pozorováno i v případě 12 hodinových schistosomul *T. szidati*, kdy v nespecifickém hostiteli nedochází k vazbě lektinů. Jinak je to na povrchu stejně starých schistosomul u specifického definitivního hostitele, kdy dochází k vazbě některých lektinů (např. PSA, Con A, SBA). Horák a kol. (1998b) se domnívají, že paraziti se ve specifickém a nespecifickém hostiteli mohou lišit schopností exprese a odvrhování sacharidových epitopů na povrchu jednotlivých stádií.

V porovnání s vazbou lektinů na různě stará schistosomula *T. szidati*, Blažová a Horák (2005) pozorovali vazbu některých lektinů (PSA, Con A) na povrchu *T. regenti* po celou dobu vývoje uvnitř hostitele. Možné rozdíly mezi druhy *T. regenti* a *T. szidati* mohou být způsobeny jiným typem migrace v těle definitivního hostitele.

Fenomén, který jsme pozorovali u lektinu UEA-I, kdy docházelo u některých jedinců k vazbě lektinu jen na zadní část těla 1,5 hodinových schistosomul a na přední část těla se lektin nevázal, pravděpodobně reprezentoval proces postupného odvrhování glykokalyxu. Podobný fenomén opačného směru pozoroval Horák a kol. (1998b) při transformaci cercárií *T. szidati* na schistosomula. Autoři pozorovali u lektinů Con A a PNA postupnou vazbu těchto lektinů od předního konce těla schistosomula, která se postupně šířila po celém těle parazita.

Lektin JAC bývá řazen mezi lektiny se specifitou ke Gal a GalNAc, ale ve skutečnosti se chová jako „polyspecifický lektin“. Je schopný vázat Gal, Man, Glc a stejně tak dobře sacharidové deriváty jako je GalNAc, GlcNAc, Neu5Ac (kyselinu N-acetylneuraminovou) a MurNAc (kyselinu N-acetylmuramovou) (Bourne a kol. 2002). Tato širokospektrá specifita je pravděpodobně důvodem vazby na povrch schistosomula neinhibovatelné jednoduchými sacharidy.

Rozdíly ve vazbě lektinů na povrch cercárií a schistosomul *T. regenti* v pracích Blažová a Horák (2005) a Podhorský a kol. (2009) mohly být způsobeny odlišným zpracováním vzorků. Blažová a Horák (2005) prováděli experimenty s vazbou lektinů na parazity, kteří byli fixováni v Bouinově fixáži a zaliti do JB4 pryskyřice. Na řezy byly následně nanášeny lektiny ve vyšší koncentraci (100 µg/ml) v porovnání s našimi experimenty. Rhodes a Milton (1998) se domnívají, že při fixování a zalévání vzorků do parafinu a pryskyřic mohou být v průběhu zpracování odloučeny popř. skryty některé sacharidy, které pak nejsou dostupné pro vazbu lektinu. Vzniklé odchylky ve výsledcích v porovnání se studií Podhorského a kol. (2009), která se zabývala vazbou lektinů na živé

cerkárie, mohly být způsobeny odlišnou šarží používaných lektinů, popř. odlišným pH používaného HEPES pufru.

Do budoucna máme v plánu porovnat vazbu lektinů na povrch stejně starých schistosomul, které byly získány *in vivo* a *in vitro* transformací. To by nám mohlo pomoci odhalit, jestli je vývoj schistosomul po *in vitro* transformaci opožděn oproti schistosomulům vyvíjejícím se v definitivním hostiteli, jak se projevilo v případě exprese Lewis X antigenu na povrchu různě transformovaných schistosomul (viz dále).

Lewis X antigen, který lidské schistosomy (*S. haematobium*, *S. japonicum* a *S. mansoni*) pravděpodobně využívají jako molekulární mimikry (Nyame a kol. 1998, Wuhler a kol. 2000), byl také námi detekován na povrchu některých stádií ptačí schistosomy *T. regenti*. Přítomnost u ptačích schistosom potvrdila jeho obecnou expresi u zástupců čeledi Schistosomatidae. Lze usuzovat, že i *T. regenti* může Lewis X antigen využívat jako molekulární mimikry, protože byla prokázána jeho exprese u ptáků (Lee a kol. 1996, D'Costa a Petitte 1999).

Na povrchu cercárií *T. regenti* nebyla přítomnost Le^x antigenu prokázána, primární protilátka se vážala jen na sekrety penetračních žláz. Obdobně tomu bylo i u cercárií *S. mansoni* v naší studii, kde sloužily jako kontroly. Tyto výsledky se shodují s prací Köster a Strand (1994), ale jsou v rozporu s výsledky autorů Nyame a kol. (2003), kteří dokumentují vazbu této protilátky i na povrch cercárií *S. mansoni*. Možné vysvětlení podávají van Remoortere a kol. (2000), kteří uvádějí, že Le^x antigen se na glykokonjugátech vyskytuje v monomerní a polymerní formě. Předpokládá, že na povrchu cercárií se Le^x antigen vyskytuje pouze v polymerní formě. Z tohoto důvodu není rozpoznáván monoklonálními protilátkami proti monomerní formě Le^x antigenu. Tato forma Le^x antigenu se vyskytuje až po transformaci na povrchu schistosomul. Obdobné to pravděpodobně bude i u cercárií *T. regenti*.

Vzniklé rozdíly ve vazbě anti-CD15 protilátky na povrch schistosomul a cercárií, ať už v případě stejného druhu (*S. mansoni*) nebo v případě porovnání exprese Le^x antigenu u *T. regenti* a *S. mansoni*, může být důsledkem odlišné metodiky v průběhu experimentu a použitím protilátek z různých zdrojů.

Naše experimenty sice potvrdily přítomnost Le^x antigenu na povrchu schistosomul *T. regenti*, ale výsledek se poněkud lišil od stejného stádia *S. mansoni*. U *S. mansoni* byla prokázána přítomnost tohoto antigenu na celém povrchu schistosomul 3 a 48 hodin po infekci a také u schistosomul získaných z plic hostitele (Köster a Strand 1994, Nyame a kol. 2003).

V našem případě nedocházelo k vazbě protilátky anti-CD15 na povrch schistosomul 1,5 hodiny po infekci. Exprese Le^x antigenu na povrchu schistosomul *T. regenti* začíná u některých jedinců již 1 den po infekci. Exprese je zahájena na anteriorním konci schistosomula. U 3 denních schistosomul dochází k expresi postupně dále po povrchu od předního konce těla k zadnímu. Rozdíly v expresi u stejně starých stádií lze vysvětlit tak, že tento proces, stejně jako řada dalších biologických procesů, není synchronizován u všech jedinců v průběhu jejich vývoje. Vliv také může mít doba od nákazy, která ale mezi jednotlivými cercářiemi reprezentuje maximálně rozdíl jedné hodiny, po kterou docházelo k infekci kachen.

Jinak tomu je u *in vitro* transformovaných schistosomul, kde ještě ani u 1 den starých schistosomul nedocházelo k expresi Le^x antigenu; až u 3 denních schistosomul se vyskytoval podobný fenomén, jako u schistosomul 1 denních po *in vivo* transformaci. Toto naznačuje, že vývoj *in vitro* transformovaných schistosomul je opožděn v porovnání se schistosomuly po *in vivo* transformaci. Tento výsledek je v rozporu s Chanovou a kol. (2009), kteří tvrdí, že schistosomula *T. regenti* po *in vitro* transformaci jsou ve svém vývoji srovnatelné se schistosomuly, které se vyvíjejí v těle definitivního hostitele. Opožděný vývoj při *in vitro* transformaci také dokumentuje Cousin a kol. (1981) u schistosomul *S. mansoni*.

Experimenty s dospělými schistosomami *T. regenti* bohužel nebyly úspěšné, ale dá se předpokládat, že i u těchto stádií bude docházet k vazbě primární protilátky anti-CD15 na celý povrch těla, jak naznačuje přítomnost tohoto antigenu na celém povrchu u 5 a 7 denních schistosomul. Přítomnost tohoto epitopu na dospělých *T. regenti* podporuje fakt, že se vyskytuje na povrchu dospělců *S. mansoni* (van Remoortere a kol. 2000, Nyame a kol. 2003).

5.2 Odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom

Barvení obsahu penetračních žláz alizarinem, lithium karmínem a Alexa Fluor® 488 bylo využito k pozorování distribuce těchto sekretů po jejich uvolnění ze žláz. K indukci vyprazdňování žláz byla využita kyselina linolová. Následné chování cercárií bylo podrobně popsáno v kapitole 4.2.1. Cercárie se nejprve obsahem penetračních žláz obalily, došlo k navázání tohoto materiálu na povrch cercárie a nakonec docházelo k odvržení sekretů z povrchu a zanechání tohoto materiálu za tělem cercárie v podobě tunelu. Tento proces by mohl odpovídat procesu penetrace, kdy cercárie *S. mansoni* prolézají pokožkou hostitele a v místě jejich penetrace zůstává „tunel“ vzniklý po degradaci tkání hostitele (Fishelson a kol. 1992). Horák a kol. (2002) prokázali přítomnost sekretů penetračních žláz okolo schistosomul a ohraničení vstupního tunelu těmito sekrety v průběhu penetrace. Na tvorbě tunelu se podílejí

produkty cirkum- i postacetabulárních žláz. Domnívali jsme se, že během tohoto procesu dochází k odvrhování glykokalyxu a že se na něm podílí nějaká komponenta penetračních žláz. Pro ověření této hypotézy byly použity fluorescenčně značené lektiny.

Také v přítomnosti lektinů docházelo po indukci vyprazdňování penetračních žláz kyselinou linolovou k navázání sekretů na povrch cercárie. Následně cercárie prolézaly tímto obsahem a odvrhovaly ho pomocí penetračních pohybů z povrchu za současného vytváření tunelu. Společně se sekretovaným obsahem penetračních žláz byl odvrhován i glykokalyx. Odvržení glykokalyxu bylo demonstrováno absencí vazby lektinů, které se vážou na povrch cercárií. V opačném případě by se lektin mohl i nadále vázat na povrch parazita, protože byl stále přítomen v roztoku.

Pozorování stejného fenoménu u sekretů obou typů penetračních žláz naznačuje smíchání těchto látek v průběhu tvorby tunelu. Tuto hypotézu také podporují experimenty s vazbou lektinů, alizarinu a lithium karmínu na sekrety penetračních žláz cercárií *T. regenti* adherovaných na podložním sklíčku, které pomohly odhalit, že se lektiny vážou na stejný typ sekretů jako alizarin a lithium karmín. Tyto výsledky nám potvrdily, že tvorba tunelu ze sekretů penetračních žláz je proces, který se odehrává identicky při značení lektiny i alizarinem a lithium karmínem a účastní se ho sekrety z obou typů žláz, které jsou pravděpodobně během tohoto procesu smíchané, a proto lze usuzovat účast obou typů penetračních žláz na odvrhování glykokalyxu.

Protože je tento proces indukován i některými lektiny (viz dále), bude potřeba ověřit, zda stimulem k odvrhování glykokalyxu je zesíťování povrchového glykokalyxu pomocí lektinů s více vazebnými místy, nebo pouhá vazba lektinu k povrchu. Toto by mohlo být odhaleno pomocí monovalentních lektinů. Ty mají jen jedno vazebné místo. Mají zachovanou aktivitu rozpoznávání sacharidů, ale nevyvolávají aglutinaci buněk, která je typická pro lektiny s více vazebnými místy (Rhodes a Milton 1998). Experimenty s monovalentními lektiny byly odloženy, protože tyto lektiny nejsou běžně komerčně dostupné ve značené formě a jejich příprava v laboratoři je komplikovaná.

Z dalších dostupných možností ke značení sacharidů jsme měli na výběr cholera toxin – podjednotku B (Cholera toxin subunit B conjugates, Invitrogen) a heterobifunkční kroslinkery s navázanou fluorescenční značkou. Cholera toxin byl vyloučen z důvodu své preferenční vazby na galaktosu, která není v glykokalyxu cercárií přítomna ve větší kvantitě, jak dokazují dřívější experimenty s vazbou lektinů na povrch cercárií *T. regenti* (Podhorský a kol. 2009). Z heterobifunkčních kroslinkerů se nejlépe jevily kroslinkery schopné konjugace molekul obsahujících sacharidy (např. glykoproteiny) k molekulám obsahujícím

sulfhydrylovou skupinu. Rádi bychom této možnosti využili v rozšiřujících pokusech věnujících se tomuto tématu.

Do budoucna bychom se rádi pokusili o izolaci a bližší charakterizaci složení glykokalyxu cercárií a tunelu vznikajícího při odvrhování glykokalyxu. Zároveň bychom rádi objasnili mechanismus odvrhování glykokalyxu cercárií při penetraci do definitivního hostitele. Dosud není jasné, zda a jak se na tomto procesu podílejí sekrety penetračních žláz anebo se jedná o jevy nezávislé na žlázách, probíhající čistě na povrchu tegumentu.

TEM experimenty byly zaměřeny na cca 45 minut stará schistosomula *T. regenti*. Pomohly nám odhalit, co se děje s glykokalyxem cercárií v průběhu penetrace do definitivního hostitele. Nákaza kachny trvala 45 minut, ihned poté došlo k jejímu usmrcení a následoval sběr schistosomul. Naše pozorování se shoduje s prací Chanové a kol. (2009), kteří pozorovali 1, 3 a 24 hodin stará schistosomula *T. regenti* i *T. szidati*. V obou případech byl dokumentován začátek tvorby dvojité membrány tegumentu již jednu hodinu od začátku penetrace. Horák a kol (1998b) prokázali kompletně vytvořenou dvojitou membránu u schistosomul *T. szidati* již 12 hodin po penetraci. K jejímu kompletnímu vytvoření pravděpodobně dochází již dříve (3 – 6 hodin po penetraci), jak je dokumentováno u lidských schistosomul *S. mansoni* a *S. japonicum* (Hockley a McLaren 1973, Sobhon a Upatham 1990). Glykokalyx cercárií *T. szidati* byl kompletně odstraněn do 12 hodin po infekci (Horák a kol. 1998b). My jsme tento fenomén pozorovali u některých schistosomul již do jedné hodiny od penetrace. U některých jiných jedinců byla patrná značně ztenčená vrstva glykokalyxu, která má jinou ultrastrukturu oproti glykokalyxu na povrchu cercárií. Domníváme se, že většina cercariálního glykokalyxu je ztracena v průběhu penetrace kůže hostitele. U schistosomul *S. mansoni* a *S. japonicum* autoři dokumentovali téměř kompletní ztrátu glykokalyxu 3 až 6 hodin po penetraci. 1 hodinu po penetraci potvrdili přítomnost glykokalyxu, který se liší svou ultrastrukturou od glykokalyxu cercárií (Hockley a McLaren 1973, Sobhon a Upatham 1990).

Do budoucna máme v plánu rozšířit ultrastrukturální charakterizace, které by nám pomohly odhalit samotný mechanismus odvrhování glykokalyxu. Prvním krokem k úspěchu je optimalizace metodiky, která se nám prozatím nedaří. Rádi bychom zjistili, zda a jak rychle při stimulaci odvrhování glykokalyxu lektiny *in vitro* dochází k tvorbě klků a dvojité membrány. Poté by se dalo lépe usuzovat, zda by šlo lektiny považovat za přirozené stimulanty odvrhování glykokalyxu, resp. transformace (viz dále).

V rámci testování 13 lektinů různých specifit ve 3 různých koncentracích jsme sledovali, že téměř všechny z nich indukují vyprazdňování penetračních žláz cercárií a některé stimulují odvrhování glykokalyxu. K sekreci obsahu penetračních žláz cercárií dochází u všech lektinů v přítomnosti vyšší koncentrace těchto látek (20 µg/ml a 10 µg/ml). Lektiny se na sekrety penetračních žláz vážou velice ochotně. Tato vazba může mít souvislost se složením obsahu penetračních žláz, které u *S. mansoni* obsahují mimo jiné glykoproteiny s O- a N-glykosylací (Jang-Lee a kol. 2007). Pomocí imunohistochemie však Mikeš a kol. (2005) nepotvrdili u cercárií *T. szidati* a *T. regenti* přítomnost obdobných sacharidů jako u cercárií *S. mansoni*. Domnívají se, že důvodem může být odlišné složení sekretů penetračních žláz u těchto druhů. Indukce vyprazdňování penetračních žláz po inkubaci s některými lektiny byla také pozorována u cercárií *S. mansoni*, i zde docházelo k vazbě lektinů na tyto sekrety (Coles a kol. 1988). Intenzita vyprazdňování penetračních žláz se snižuje současně s klesajícími koncentracemi přidávaných lektinů. Z našich výsledků nelze všeobecně říci, které lektiny (s jakou specifitou) indukují sekreci penetračních žláz nejvíce, protože množství sekretovaného obsahu nelze přesně kvantifikovat. Zároveň nebyla pozorována souvislost mezi vazbou lektinu na povrch cercárie a indukcí vyprazdňování penetračních žláz. Lektiny, které se neváží na povrch, také indukují tento proces ve stejné intenzitě jako lektiny vázající se na povrch těchto stádií.

Odvrhování glykokalyxu bylo stimulováno 6 lektiny v koncentraci 20 µg/ml. Nejvíce je tento proces podporován lektiny se specifitou k Fuc (UEA-I a LTA) a lektinem JAC („polyspecifický lektin“). Stimulaci tohoto procesu lektiny se specifitou k Fuc si vysvětlujeme velkou přítomností tohoto sacharidu na terminálních pozicích v glykokalyxu cercárií *T. regenti*. Lektin JAC zde bude hrát roli díky své širší sacharidové specifitě. Domníváme se, že odvrhování glykokalyxu může být stimulováno na základě specifických interakcí lektin-sacharid, kdy vazebným ligandem pro lektin bude zřejmě nějaká fukosylovaná molekula glykokalyxu. Koncentrace lektinů 1 µg/ml se ukázala jako příliš nízká, protože nedochází ani k detekci vazby na povrch cercárií a ani nestimuluje námi sledované procesy. Koncentrační závislost podporuje naši hypotézu. Nedávno byl pozorován vliv lektinů, které specificky rozpoznávají povrch miracidíí, na stimulaci *in vitro* transformace těchto stádií na sporocysty u *Fasciola hepatica* (Georgieva a kol. 2012). V našich experimentech také docházelo, s výjimkou lektinu SBA, ke specifické vazbě lektinů stimulujících odvrhování glykokalyxu na povrch cercárií *T. regenti*. Předpokládáme, že i v případě schistosom by lektiny mohly hrát roli při stimulaci transformace na schistosomula *in vivo*, uvnitř hostitele. Zejména mannose binding lectin (MBL), který se vyskytuje v krevním řečišti hostitele, by se mohl

účastnit indukce tohoto procesu. Tento lektin je znám svou širší sacharidovou specifitou. Jeho vazba na povrch různých stádií *S. mansoni* byla ověřena (Klabunde a kol. 2005). Do budoucna máme v plánu vyzkoušet vliv rekombinantního MBL na stimulaci odvrhování glykokalyxu. Lze hypotetizovat, že vápník, který je obsažen v cirkumacetabulárních žlázách cercárií schistosom (Dresden a Elin 1975, Drickamer 1988, Mikeš a kol. 2005), by mohl podporovat interakci MBL se sacharidy cercáriového glykokalyxu, protože kolektiny, mezi které MBL patří, vyžadují pro interakci se sacharidy přítomnost vápenatých iontů. Také Georgieva kol. (2012) naznačuje možný vliv interakcí lektinů původem z mezipřítelenských plžů s povrchovými sacharidy na stimulaci transformace miracidí na sporocysty nejen v *in vitro* podmínkách.

U *S. mansoni* byla indukce sekrece obsahu penetračních žláz lektiny WGA a PNA inhibována přidáním specifických sacharidových inhibitorů (Coles a kol. 1988). My jsme také sledovali vliv sacharidových inhibitorů na *in vitro* indukci vyprazdňování penetračních žláz lektiny. Naše výsledky ukázaly, že i přes přidání sacharidových inhibitorů k lektinům dochází k indukci vyprazdňování penetračních žláz a vazbě lektinů na tyto sekrety. U některých cercárií docházelo po inhibici ke snížení intenzity vyprazdňování penetračních žláz. Účast samotných sacharidů na tomto procesu nebyla prokázána. Není možné předpokládat, že tento proces je indukován nespecificky a na jeho vyvolání nemusí mít podíl vazebná místa lektinů, která rozpoznávají sacharidy. Tento jev může být ale spíše způsoben tím, že jsme pro inhibici použili monosacharidy, které neinhibují daný lektin optimálně, a proto se mohl vázat dál na nějaké vhodnější ligandy na cercárii, byť v menší míře – pak by se jednalo naopak o vysoce specifickou indukci. Toto bude nutno důkladně ověřit.

Použití sacharidových inhibitorů bylo komplikováno faktem, že lektiny vážou s vyšší afinitou komplexnější struktury glykanů než monosacharidů. Většina lektinů má vazebné místo interagující s lineární sacharidovou sekvencí o 3 – 4 monosacharidových podjednotkách, některé lektiny mohou vázat i větší glykany, které ale zpravidla nepřesahují délku 7 monosacharidů (Rhodes a Milton 1998). Sacharidový inhibitor je obvykle monosacharid, který nejlépe inhibuje vazbu lektinu, např. lektin UEA-I „je specifický pro Fuc“. Ve skutečnosti lektiny rozpoznávají složitější struktury, které ve většině případů zůstávají neznámé (Rhodes a Milton 1998).

Georgieva a kol. (2012) prokázali, že *in vitro* transformace miracidí na sporocysty u *F. hepatica* není indukována lektiny v přítomnosti jejich sacharidových inhibitorů. I v našem případě docházelo při přidání specifických sacharidových inhibitorů k inhibici odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*. Pravděpodobně tedy dochází k vyvolání tohoto procesu po

specifické vazbě lektinů (jejich „carbohydrate-recognition domain“) na cukerné ligandy v glykokalyxu. Zajímavý fenomén byl pozorován při použití lektinů, které indukují odvrhování glykokalyxu, v kombinaci s neinhibujícími sacharidy. Tento pokus nám měl pomoci odhalit, zda všeobecně volné sacharidy inhibují odvrhování glykokalyxu. Při některých kombinacích lektinu a neinhibujícího sacharidu jsou výsledky nesourodé, někdy docházelo k odvrhování glykokalyxu – a naopak, při některých opakováních experimentu za stejných podmínek k tomuto procesu nedocházelo. Také při použití některých sacharidů docházelo „netypicky“ k inhibici vazby lektinů na povrch cerkárií. Je téměř jisté, že právě tato pozorování odrážejí širší specifitu lektinů, které mohou být inhibovány i jiným sacharidem než tím, který je běžně prezentován jako nejsilnější inhibitor vazby lektinu na zkoumanou tkáň. Při porovnání zvolených neinhibujících sacharidů a vazebných preferencí lektinů (viz tab. 1) je patrné, že existují souvislosti mezi inhibicí odvrhování glykokalyxu námi zvoleným „netypickým“ sacharidem a vazebnou preferencí lektinu, i když to neplatí vždy. Např. lektin UEA-I má vazebnou preferenci $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow >(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4)_n > \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow > \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Gal} > \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$, ale sacharidový inhibitor Gal/GalNAc neinhibuje vazbu lektinu na povrch cerkárie a ani indukci odvrhování glykokalyxu tímto lektinem. Jinak tomu bylo v případě inhibitoru MetMan/MetGlc. Po jeho působení byla snížena intenzita fluorescence na povrchu cerkárií a v polovině experimentů také docházelo k inhibici odvrhování glykokalyxu. Podobný fenomén byl pozorován i u ostatních lektinů. Výsledky s neinhibující sacharidovými inhibitory naznačují, že všeobecně volné sacharidy neinhibují odvrhování glykokalyxu. Inhibice tohoto procesu sacharidy bude mít pravděpodobně souvislost s vazebnými preferencemi lektinů.

Fakt, že někdy docházelo k odvrhování glykokalyxu a někdy ne, může odrážet dosud nezjištěné komplexní struktury sacharidových ligandů daných lektinů. Dalším důvodem může být výskyt lektinů v různých izoformách, které se odlišují vazebnou preferencí či afinitou k různým sacharidovým řetězcům. Na tomto jevu je mj. založen imunitní systém bezobratlých (Horák a van der Knaap 1997, Ortíz a kol. 2000). Tento jev by nám dále mohl pomoci vysvětlit např. odlišnou vazbu stejných lektinů na povrch cerkárií při porovnávání našich výsledků s jinými publikacemi.

Naše experimenty ukázaly vazbu CFSE na obsah penetračních žláz cerkárií *T. regenti*, obdobně tomu bylo také s CFSA-SE u cerkárií *S. mansoni* v práci Paveley a kol. (2009). Lyons (2000, cit. dle Paveley a kol. 2009) naznačuje, že přítomnost esteráz nebo proteáz v těchto žlázách pravděpodobně usnadňuje účinnost štípání CFSE z jeho neaktivního na

fluorescenční stav. Také se nám podařilo prokázat vazbu této látky na povrch cercárií *T. regenti*. Toto bylo v rozporu s výše zmíněnou prací, kde dokumentují relativní absenci vazby CFDA-SE na vnější povrch, ale i vnitřní orgány cercárií *S. mansoni*. Autoři se domnívali, že tato látka nereaguje s glykokalyxem a navrhuji, že CFDA-SE vstupuje do žláz přes jejich vývody (Paveley a kol. 2009). Podobně tomu bylo u larev *Toxocara canis*, kde bylo prokázáno zainkorporování CFSE do jejich trávicího traktu (Kolbeková a kol. 2011). Domníváme se, že u cercárií *T. regenti*, nedochází k vazbě této látky jen na glykokalyx, ale také do cytoplazmy tegumentu, popř. na některé další struktury, protože nedochází při odvrhování glykokalyxu ke ztrátě fluorescence povrchu cercárií, jak jsme to pozorovali při obdobných pokusech s lektiny (viz kapitola 4.2.2). Při našich experimentech samotná CFSE téměř neovlivňovala pohyblivost cercárií, i když se drobné výjimky vyskytly. V ostatních pracích CFSE ani CFDA-SE téměř neovlivňovaly infekční potenciál a schopnost migrace larválních stádií (Paveley a kol. 2009, Bourke a Mountford 2011, Kolbeková a kol. 2011).

Z důvodu překryvu excitačního a emisního spektra CFSE a CFDA-SE s Alexa Fluor® 488 by bylo vhodné do budoucna otestovat např. Cell Trace Far-red DDAO-SE (C34553, Invitrogen), který je podobný CFDA-SE. Jeho výhodou je větší fotostabilita a minimální spektrální překryv s jinými běžně používanými fluorochromy (Bourke a Mountford 2011). Kolokalizační experiment se značením sekretů penetračních žláz a glykokalyxu cercárií by mohl být založen na kombinaci CFSE s lektinem, který by byl značen jiným fluorochromem.

5.3 Charakterizace molekul zapojených v odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*

Výchozím krokem pro charakterizaci molekul zapojených do procesu odvrhování glykokalyxu byl sběr obsahu penetračních žláz cercárií *T. regenti* a *T. szidati* pro účely proteomické analýzy. Jak již bylo řečeno, tato analýza v současné době probíhá a výsledky dosud nemáme k dispozici. Proto jsme začali experimenty s rekombinantní peptidázou původem z penetračních žláz, která by se mohla na odvrhování glykokalyxu podílet, a dále s inhibitory peptidáz, které by v případě účasti endogenní (žlázové) peptidázy tento proces inhibovaly.

První experimenty byly založeny na testování rekombinantní formy cysteinové peptidázy katepsinu B2, který je přítomen v postacetabulárních žlázách cercárií *T. regenti* (Dolečková a kol. 2009). Tímto směrem jsme se ubírali na základě výsledků, které jsou známy u cercárií *S. mansoni*, u kterých se předpokládá účast serinové proteázy na odvrhování

glykokalyxu (Marikovsky a kol. 1988a). Oproti této studii naše výsledky naznačují, že katepsin B2 pravděpodobně nemá vliv na odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*, jak je dokumentováno lektinovými markery transformace, kdy dochází stále ke stejné reakci na povrchu cercárií. Tento výsledek byl podpořen experimenty s širokospektrými inhibitory cysteinový proteáz (E-64 a E-64d), které inhibují i katepsin B2. Bylo patrné, že i přes zainhibování žláзовého katepsinu B2 preinkubací cercárií s inhibitorem dochází k odvrhování glykokalyxu. Naše výsledky nepodporují hypotézu známou u cercárií *S. mansoni*, kde autoři předpokládají účast 28 kDa serinové proteázy z penetračních žláz cercárií na odvrhování glykokalyxu (Marikovsky a kol. 1988a, 1988b, 1990). Jejich hypotéza je založena na lokalizaci 28 kDa serinové proteázy za pomoci monospecifické králičí protilátky v samotném glykokalyxu cercárií (Marikovsky a kol. 1990). Tato proteáza není pravděpodobně exprimována v glykokalyxu cercárií, ale dochází k jejímu navázání na povrch v průběhu sekrece obsahu penetračních žláz.

Dále jsme testovali vybrané inhibitory dalších peptidáz, které by se teoreticky mohly podílet na odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom. Inhibitory serinových proteáz (aprotinin, leupeptin a TLCK) byly vybrány v návaznosti na výsledky Marikovsky a kol. (1988a), ale jejich vliv na tento proces nebyl patrný. EGTA a EDTA byly vybrány jako zástupci inhibitorů metalopeptidáz a chelátorů vápenatých iontů (vápník je bohatě přítomen v cirkumacetabulárních žlázách *T. regenti* a *T. szidati*) (Mikeš a kol. 2005). Metaloproteináza byla nedávno identifikována v penetračních žlázách *S. mansoni*, jako druhá nejhojnější peptidáza v těchto žlázách po cercariální elastáze (Curwen a kol. 2006). Ani v tomto případě nedocházelo k inhibici odvrhování glykokalyxu po indukci kyselinou linolovou. Toto je v rozporu s hypotézou Modha a kol. (1998), který předpokládal účast vápníku z cirkumacetabulárních žláz cercárií na stimulaci odvrhování glykokalyxu.

I přes tyto výsledky chceme dále ověřit účast sekretů penetračních žláz cercárií na odvrhování glykokalyxu. Pro tuto hypotézu svědčí fakt, že k odvrhování glykokalyxu dochází od předního konce těla cercárie, kde vyúsťují vývody penetračních žláz (Marikovsky a kol. 1988a, 1990, Fishelson a kol. 1992, Horák a kol. 1998b). Dosud není jasné, zda se na stimulaci tohoto procesu bude podílet jedna, dvě či více peptidáz či fosfolipáz, popř. nějaká úplně jiná molekula ze sekretů penetračních žláz.

V budoucnosti by nám mohly v rozřešení této otázky pomoci výsledky proteomické analýzy obsahu penetračních žláz cercárií *T. regenti* a *T. szidati*. Je možné, že na odvrhování glykokalyxu se podílejí i molekuly lokalizované v hlavové žláze cercárie; někteří autoři se domnívají, že obsahuje látky s hydrolytickou aktivitou, které se účastní penetrace, a tudíž by

se mohly účastnit i odvrhování glykokalyxu (Curwen a Wilson 2003). Rádi bychom také otestovali inhibitory fosfolipáz. Fosfolipázy umožňují oddělení proteinů kotvených GPI kotvou. GPI-fosfolipáza D byla detekována u cercárií a dospělců *Schistosoma mansoni* (Hawn a Strand 1993), a proto by mohla fungovat v průběhu odvrhování glykokalyxu, popř. při periodické obměně povrchové membrány u schistosomul a dospělců.

Další látky, které by se mohly podílet na odvrhování glykokalyxu lze hledat mezi výsledky z proteomických analýz žláзовých produktů *S. mansoni* (Curwen a kol. 2004, Knudsen a kol. 2005, Curwen a kol. 2006). Jako příklad lze uvést glykolytické proteiny, které byly identifikovány v sekretech penetračních žláz, popř. proteiny, které jsou regulované vápníkem nebo vážou vápenaté ionty. Do budoucna by bylo vhodné otestovat také inhibitory glykosidáz.

Výsledky této práce odhalily některá nová a zajímavá fakta. I přesto nadále zůstává řada dosud nevysvětlených otázek. Např. jestli je proces odvrhování glykokalyxu uskutečňován molekulami žláz, nebo jestli k tomuto procesu dochází obměnou membrány na povrchu tegumentu. Dosud není zcela zřejmé, jaké jsou stimuly pro odvrhování glykokalyxu. V úvahu přicházejí mastné kyseliny kůže, nebo produkty žláz, jejichž sekrece je stimulována mastnými kyselinami kůže, nebo jiné exogenní faktory z hostitele (např. MBL, jak nasvědčují naše výsledky s lektiny), případně kombinace více faktorů. Odvrhování glykokalyxu je složitý kontinuální proces, který probíhá v návaznostech a jednotlivé fáze lze od sebe jen těžko oddělit *in vitro* pro účely studia tohoto procesu. Rádi bychom na toto téma navázali v průběhu mého postgraduálního studia.

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací a odvrhováním glykokalyxu u cercárií *T. szidati* a *T. regenti*. Glykokalyx představuje pro cercárie nepostradatelnou strukturu, která jim poskytuje ochranu před mechanickými a chemickými vlivy prostředí. Je odvrhován z povrchu cercárií v průběhu penetrace do definitivního hostitele jako vysoce imunogenní struktura, která interaguje s imunitním systémem hostitele.

Výsledky této práce přinesly některé nové a zajímavé informace. Pomocí fluorescenčně značených lektinů a monoklonální protilátky proti Lewis X antigenu se nám podařilo charakterizovat změny v povrchové glykosylaci cercárií *T. regenti* při transformaci na schistosomula. Odhalili jsme odlišný sacharidový profil u cercárií a schistosomul, který byl dokumentován rozdíly ve vazbě těchto látek na povrch cercárií a schistosomul. V porovnání se stejně starými schistosomuly *S. mansoni*, u kterých byla prokázána přítomnost tohoto antigenu na celém povrchu, začínala exprese Lewis X antigenu v přední části těla schistosomul *T. regenti*. Lektiny UEA-I, LTA a PNA byly vybrány jako markery transformace u tohoto druhu.

Zjistili jsme, že lektiny stimulují vyprazdňování penetračních žláz cercárií a indukují odvrhování glykokalyxu. Odvrhování glykokalyxu je stimulováno zejména lektiny se specifitou k fukose. V této souvislosti předpokládáme možnou účast mannose binding lectinu (MBL) při stimulaci transformace cercárií na schistosomula *in vivo*, uvnitř hostitele. Specifita tohoto procesu se nám podařila prokázat kombinacemi se sacharidovými inhibitory a neinhibujícími sacharidy.

K téměř kompletnímu odvržení glykokalyxu dochází v průběhu penetrace cercárie do definitivního hostitele, jak naznačují výsledky studia ultrastruktury pomocí TEM. Při odvrhování glykokalyxu za *in vitro* podmínek byla pozorována silná vazba sekretů z cirkum- a postacetabulárních žláz na povrch cercárií *T. szidati* a *T. regenti*. Cercárie se nejprve obsahem penetračních žláz obalily, došlo k navázání tohoto materiálu na povrch cercárie a nakonec docházelo k odvržení sekretů a glykokalyxu z povrchu a zanechání tohoto materiálu za tělem cercárie v podobě tunelu. Tento fenomén byl ověřen různými typy barvení. Odvržení glykokalyxu bylo demonstrováno absencí vazby lektinů na povrch schistosomul.

Naše výsledky ukázaly, že samotný katepsin B2 se neúčastní odvrhování glykokalyxu u cercárií *T. regenti*. Ani další potenciální peptidázy (cysteinové, serinové a metalopeptidázy) se tohoto procesu pravděpodobně neúčastní, jak naznačují výsledky pokusů s inhibitory

vybraných peptidáz. I přes tyto výsledky chceme ověřit účast sekretů penetračních žláz cercárií na odvrhování glykokalyxu.

Studium mechanismu odvrhování glykokalyxu je značně komplikované pro komplexitu tohoto procesu. Na tuto práci bych ráda navázala v průběhu mého postgraduálního studia. Máme v plánu využít TEM, která by nám mohla pomoci poodhalit samotný mechanismus odvrhování glykokalyxu. Také bychom se rádi pokusili o izolaci a bližší charakterizaci složení glykokalyxu cercárií a tunelu vznikajícího při jeho odvrhování. Tento výzkum by mohl významně přispět ke studiu únikových mechanismů schistosom při penetraci do definitivního hostitele a mohl by být využit pro studium odvrhování glykokalyxu u lidských schistosom.

7 Použitá literatura

Allendoerfer K. L., Durairaj A., Matthews G. A., Patterson P. H. (1999): Morphological domains of Lewis X/FORSE 1 immunolabeling in the embryonic neural tube are due to developmental regulation of cell surface carbohydrate expression. *Developmental Biology* 211:208–219.

Basch P. F. (1981): Cultivation of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of Parasitology* 67: 179-185.

Beisler G. K., Nakao M., Matsuda H., Tahala H. (1984): Characterization of the carbohydrates of *Schistosoma japonicum* adult worm, egg and cercaria by analysis of lectin binding and antibody reaction. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 54: 263-273.

Blair D., Islam K. S. (1983): The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology* 5: 89-117.

Blažová K., Horák P. (2005): *Trichobilharzia regenti*: the developmental differences in natural and abnormal hosts. *Parasitology International* 54: 167-172.

Bourke C. D., Mountford A. P. (2011): Using fluorescent labelling of schistosome cercariae to investigate innate immune response during infection. Abstracts of the Annual Congress of the British Society for Immunology, Liverpool UK, 5th – 8th December 2011, Altmann D. (Ed.).

Bourne Y., Astoul C. H., Zamboni V., Peuman W. J., Menu-Bouaouiche L., van Damme E. J. M., Barre A. Rougé P. (2002): Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *The Biochemical Journal* 364: 173-180.

Caulfield J. P., Cianci C. M. L., McDiarmid S. S., Suyemitsu T., Schmid K. (1987): Ultrastructure, carbohydrate, and amino acid analysis of two preparations of the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 73: 514-522.

Caulfield J. P., Yuan H. C., Cianci C. M. L., Hein A. (1988): *Schistosoma mansoni*: Development of the cercarial glycocalyx. *Experimental Parasitology* 65: 10-19.

Coles G. C., Jansson H.-B., Zuckerman B. M. (1988): Lectin studies of surface carbohydrates and induction of gland secretion in the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Chemical Ecology* 14: 691-700.

Collins J. J., King R. S., Cogswell A., Williams D. L., Newmark P. A. (2011): An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1009 (1-17).

- Cousin C. E., Stirewalt M. A., Dorsey C. H. (1981):** *Schistosoma mansoni*: ultrastructure of early transformation of skin- and shear-pressure-derived schistosomules. *Experimental Parasitology* 51: 341-365.
- Crabtree J. E., Wilson R. A. (1985):** *Schistosoma mansoni*: an ultrastructural examination of skin migration in the hamster cheek pouch. *Parasitology* 91: 111–120.
- Curwen R. S., Ashton P. D., Johnston D. A., Wilson R. A. (2004):** The *Schistosoma mansoni* soluble proteome a comparison across four life-cycle stages. *Molecular & Biochemical Parasitology* 138: 57-66.
- Curwen R. S., Ashton P. D., Sundaralingam S., Wilson R. A. (2006):** Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Molecular and Cellular Proteomics* 5: 835-844.
- Curwen R. S., Wilson R. A. (2003):** Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends in Parasitology* 19: 63-66.
- Dalton J. P., Clough K. A., Jones M. K., Brindley P. J. (1997):** The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 114: 105-112.
- D'Costa S., Petitte J.-N. (1999):** Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *The International Journal of Developmental Biology* 43: 349-356.
- De Melo A. L., Machado C. R., Pereira L. H. (1993):** Interaction between neutrophils and *Schistosoma mansoni* larvae *in vivo*. A transmission electron microscopic study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 35: 29-33.
- Dolečková K., Kašný M., Mikeš L., Cartwright J., Jedelský P., Schneider E. L., Dvořák J., Mountford A. P., Craik C. H. S., Horák P. (2009):** The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology* 39: 201-211.
- Dolečková K., Kašný M., Mikeš L., Mutapi F., Stack C., Mountford A. P., Horák P. (2007):** Peptidases of *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) and its molluscan host *Radix peregra* s. lat. (Lymnaeidae): construction and screening of cDNA library from intramolluscan stages of the parasite. *Folia Parasitologica* 54: 94-98.
- Dorsey C. H. (1975):** *Schistosoma mansoni*: development of acetabular glands of cercaria at ultrastructural level. *Experimental Parasitology* 37: 37-59.
- Dorsey C. H. (1976):** *Schistosoma mansoni*: description of the head gland of cercariae and schistosomules at the ultrastructural level. *Experimental Parasitology* 39: 444-459.

- Dorsey C. H., Cousin C. E., Lewis F. A., Stirewalt M. A. (2002):** Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33: 279-323.
- Dresden M. H., Edlin E. M. (1975):** *Schistosoma mansoni*: calcium content of cercariae and its effects on protease activity *in vitro*. *The Journal of Parasitology* 61: 398-402.
- Drickamer K. (1988):** Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 9557-9560.
- Drickamer K. (1994):** Molecular structure of animal lectins. In: Fukuda M., Hindsgaul O. (Eds.), *Frontiers in Molecular Biology*. IRL Press, Oxford.
- Dvořák J., Mashiyama S. T., Braschi S., Sajid M., Knudsen G. M., Hansell E., Lim K. C., Hsieh I., Bahgat M., Mackenzie B., Medzihradsky K. F., Babbitt P. C., Caffrey C. R., McKerrow J. H., (2008):** Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie* 90: 345–358.
- Espinoza B., Tarrab-Hazdai R., Silman I., Arnon R. (1988):** Acetylcholinesterase in *Schistosoma mansoni* is anchored to the membrane via covalently attached phosphatidylinositol. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29: 171-179.
- Feiler W., Haas W. (1988a):** Host-finding in *Trichobilharzia ocellata* cercariae: swimming and attachment to the host. *Parasitology* 96: 493-505.
- Feiler W., Haas W. (1988b):** *Trichobilharzia ocellata*: chemical stimuli of duck skin for cercarial attachment. *Parasitology* 96: 507-517.
- Fishelson Z., Amiri P., Friend D. S., Marikovsky M., Pettitt M., Newport G., Mckerrow J. H. (1992):** *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. *Experimental Parasitology* 75: 87-98.
- Fox N., Damjanov I., Knowles B.B., Solter D. (1983):** Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Research* 43: 669-678.
- Geijtenbeek T. B., van Vliet S. J., Engering A., 't Hart B. A., Van Kooyk Y. (2004):** Self- and non-self-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 22:33–54.
- Georgieva K., Georgieva S., Mizinska Yana, Stoitsova S. R. (2012):** *Fasciola hepatica* miracidia: Lectin binding and stimulation of *in vitro* miracidium-to-sporocyst transformation. *Acta Parasitologica* 57: 46-52.
- Gooi H. C., Feizi T., Kapadia A., Knowles B. B., Solter D., Evans M. J. (1981):** Stage-specific embryonic antigeninvolves $\alpha 1 \rightarrow 3$ fucosylated type 2 blood group chains. *Nature* 292: 156–158.

Haas W. (2001): Host finding mechanisms. In: Biology, Structure, Function: Encyclopedic Reference of Parasitology (H. Mehlhorn, ed.), edn 2: pp. 382-383. Heidelberg: Springer-Verlag.

Haas W., Diekhoff D., Koch K., Schmalfuss G., Lov C. (1997): *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. The Journal of Parasitology 83: 1079-1085.

Haas W., Pietsch U. (1991): Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. Parasitology Research 77: 642-644.

Haas W., van der Roemer A. (1998): Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. Parasitology Research 84: 787-795.

Hakomori S., Nudelman E., Lavery S., Solter D., Knowles B. B. (1981): The hapten structure of a developmentally regulated glycolipid antigen (SSEA-1) isolated from human erythrocytes and adenocarcinoma: a preliminary note. Biochemical and Biophysical Research Communications 100: 1578–1586.

Hawn T. R., Strand M. (1993): Detection and partial characterization of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase activities from *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 59: 73-81.

Hittelet A., Camby I., Nagy N., Legendre H., Bronckart Y., Decaestecker C., Kaltner H., Nifant'ev N. E., Bovin N. V., Pector J. C., Salmon I., Gabius H. J., Kiss R., Yeaton P. (2003): Binding sites for Lewis antigens are expressed by human colon cancer cells and negatively affect their migration. Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology 83:777–787.

Hockley D. J. (1973): Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. Advances in Parasitology 11: 233-305.

Hockley D. J., McLaren D. J. (1973): *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. International Journal of Parasitology 3: 13-25.

Hokke C. H., Yazdanbakhsh M. (2005): Schistosome glycans and innate immunity. Parasite Immunology 27: 257-264.

Horák P. (1995): Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. Folia Parasitologica 42: 255-265.

Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. (1999): *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. Parasitology 119: 577-581.

Horák P., Grubhoffer L., Mikeš L., Tichá M. (1997): Lectins of *Trichobilharzia szidati*. Parasite 1: 27-35.

Horák P., Kolářová L. (2011): Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. Freshwater Biology 56: 779-790.

- Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002):** Biology of the *Schistosoma* genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology* 52: 155-233.
- Horák P., Kolářová L., Dvořák J. (1998a):** *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite* 5: 349-357.
- Horák P., Kovář L., Kolářová L., Nebesářová J. (1998b):** Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116: 139-147.
- Horák P., Mikeš L. (1995):** Cercarial surface saccharides of six Trematode species from the pond snail, *Lymnea stagnalis*. *Parasite* 2: 419-421.
- Horák P., van der Knaap W. P. W. (1997):** Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica* 44: 161-172.
- Hrádková K. and Horák P. (2002):** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology* 76: 137-141.
- Huang H., Tsai P., Khoo K. (2001):** Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of *Schistosoma mansoni* cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X antigen. *Glycobiology* 11: 395-406.
- Hussein A. H., Kaddah M. A., Hamadto H. H., El-Hayawan I. A., Strickland P. T., Abubaker S., Shift C. J. (1997):** *Schistosoma mansoni*: the immune response against cercarial glycocalyx. *The Journal of Parasitology* 83: 424-429.
- Chaloupecká J. (2010):** Vlastnosti a funkce glykokalyxu cercárií motolic. Bakalářská práce, PřF UK v Praze.
- Chanová M., Bulantová J., Máslo P., Horák P. (2009):** *In vitro* cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research* 104: 1445-1452.
- Chanová M., Lichtenbergová L., Bulantová J., Mikeš L., Horák P. (2012):** *Trichobilharzia regenti*: Antigenic structures of intravertebrata stages. *Central European Journal of Biology* 7: 83-90.
- Jang-Lee J., Curwen R. S., Ashton P. D., Tissot B., Mathieson W., Panico M., Dell A., Wilson R. A., Haslam S. M. (2007):** Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. *Molecular and Cellular Proteomics* 6: 1485-1499.
- Johnston D. S., Wright W. W., Shaper J. H., Hokke C. H., Van den Eijnden D. H., Joziassé D. H. (1998):** Murine spermzona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 1888-1895.

- Kašný M., Mikeš L., Dalton J. P., Mountford A. P., Horák P. (2007):** Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134: 1599–1609.
- Kemp W. M. (1970):** Ultrastructure of the cercarienüllen reaktion of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 56: 713-723.
- Khoo K.-H., Huang H.-H., Lee K.-M. (2001):** Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* 11: 149-163.
- Khoo K.-H., Sarda S., Xu X., Caulfield J. P., McNeil M. R., Homans S. W., Morris H. R. Dell A. (1995):** A unique multifucosylated-3GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1-motif constitutes the repeating unit of the komplex O-Glycans derived from the cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 17114-17123.
- Klabunde J., Berger J., Jensenius J. C., Klinkert M., Zelck U. E., Kremsner P. G., Kun J. F. J. (2000):** *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannan-binding lectin to surface glycoproteins to cercariae and adult worms. *Experimental Parasitology* 95: 231-239.
- Knudsen G. M., Medzihradszky K. F., Lim K.-C., Hansell E., McKerrow J. H. (2005):** Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Molecular and Cellular Proteomics* 4: 1862-1875.
- Ko A. I., Dräger U. C., Harn D. A. (1990):** A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4159-4163.
- Kolářová L., Skirnisson K., Horák P. (1999):** Schistosome cercariae as the swimmer's itch in Iceland. *Journal of Helminthology* 73: 215-220.
- Kolbeková P., Kolářová L., Větvička D., Syrůček M. (2011):** Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. *Parasitology Research* 108: 1007-1014.
- Köster B., Strand M. (1994):** *Schistosoma mansoni*: immunolocalization of two different fucose-containing carbohydrate epitopes. *Parasitology* 108: 433-446.
- Kouřilová P., Kolářová L. (2002):** Variations in immunofluorescent antibody response against *Trichobilharzia* and *Schistosoma* antigens in compatible and incompatible hosts. *Parasitology Research* 88: 513-521.
- Laursen S. B., Hedemand J. E., Thiel S., Willis A. C., Skriver E., Madsen P. S., Jensenius J. C. (1995):** Collectin in a non-mammalian species: isolation and characterization of mannan-binding protein (MBP) from chicken serum. *Glycobiology* 5: 553-561.

- Lee K. P., Carlson L. M., Woodcock J. B., Ramachandra N., Schultz T. L., Davis T. A., Lowe J. B., Thompson C. B., Larsen R. D. (1996):** Molecular cloning and characterization of CFT1, a developmentally regulated avian $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 32960-32967.
- Ligasová A., Bulantová J., Šebesta O., Kašný M., Kaberna K., Mikeš L. (2011):** Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* – ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. *Parasite and Vectors* 4: 162 (1-12).
- Linder E. (1985):** *Schistosoma mansoni*: visualization with fluorescent lectins of secretions and surface carbohydrates of living cercariae. *Experimental Parasitology* 59: 307-312.
- Liu F., Zhou Y., Wang Z. Q., Lu G., Zheng H., Brindley P. J., McManus D. P., Blair D., Zhang Q. H., Zhong Y. et. al. (2009):** The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature* 460: 345–351.
- Lyons A. B. (2000):** Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* 243: 147-154.
- Marikovsky M., Arnon R., Fishelson Z. (1988a):** Proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni* promote resistance to killing by complement. *Journal of Immunology* 141: 273-278.
- Marikovsky M., Arnon R., Fishelson Z. (1990):** *Schistosoma mansoni*: localization of the 28 kDa secreted protease in cercaria. *Parasite Immunology* 12: 389-401.
- Marikovsky M., Fishelson Z., Arnon R. (1988b):** Purification and characterization of proteases secreted by transforming schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30: 45-54.
- Matsumura K., Shimada M., Sato K., Aoki Y. (1990):** Praziquantel-induced secretion of proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni* cercariae. *The Journal of Parasitology* 76: 436-438.
- McKerrow J. H., Pino-Heiss S., Linquist R., Werb Z. (1985):** Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 3703-3707.
- McLaren D. J., Hockley D. J. (1976):** *Schistosoma mansoni*: the occurrence of microvilli on the surface of the tegument during transformation from cercaria to schistosomulum. *Parasitology* 73: 169-187.
- McLaren D. J., Hockley D. J. (1977):** Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* 269: 147-149.
- Meuleman E. A., Huyer A. R., Mooij J. H. (1984):** Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology* 34: 414-417.

Meuleman E. A., Lyaruu D. M., Khan M. A., Holzmann P. J., Sminia T. (1978): Ultrastructural changes in body wall of *Schistosoma mansoni* during transformation of miracidium into mother sporocyst in snail host *Biomphalaria pfeifferi*. Zeitschrift für Parasitenkunde 56: 227-242.

Mikeš L., Zídková L., Kašný M., Dvůrák J., Horák P. (2005): *In vitro* stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products. Parasitology Research 96: 230-241.

Modha J., Redman C. A., Thornhill J. A., Kusel J. R. (1998): Schistosomes: unanswered questions on the basis biology of the host-parasite relationship. Parasitology Today 14:396-401.

Morris G. P. (1971): The fine structure of the tegument and associated structures of the cercariae of *Schistosoma mansoni*. Zeitschrift für Parasitenkunde 36: 15-31.

Mulvenna J., Hamilton B., Nagaraj S. H., Smyth D., Loukas A., Gorman J. J. (2009): Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, *Ancylostoma caninum*. Molecular and Cellular Proteomics 8: 109-121.

Nanduri J., Dennis J. E., Rosenberrys T. L., Mahmoud A. A. F., Tartakoff A. M. (1991): Glycocalyx of bodies versus tails of *Schistosoma mansoni* cercariae lectin-binding, size, charge, and electron microscopic characterization. The Journal of Biological Chemistry 266: 1341-1347.

Neth O., Jack D. L., Dodds A. W., Holzel H., Klein N. J., Turner M. W. (2000): Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. Infection and Immunity 68: 688-693.

Neuhaus W. (1952): Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen. Zeitschrift für Parasitenkunde 15: 203-266.

Nielsen O. L., Jorgensen P. H., Hedemand J., Jensenius J. C., Koch C., Laursen S. B. (1998): Immunohistochemical investigation of the tissue distribution of mannan-binding lectin in non-infected and virus-infected chickens. Immunology 94: 122-128.

Ni Y., Tizard I. (1996): Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. Veterinary Immunology and Immunopathology 55: 205-223.

Nyame A. K., Debose-Boyd R., Long T. D., Tsang V. C., Cummings R. D. (1998): Expression of Le^x antigen in *Schistosoma japonicum* and *S. haematobium* and immune responses to Le^x in infected animals: lack of Le^x expression in other trematodes and nematodes. Glycobiology 8: 615-624.

Nyame A. K., Lewis F. A., Doughty B. L., Correa-Oliveira R., Cummings R. D. (2003): Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention. Experimental Parasitology 104: 1-13.

- Olivier L. (1949):** Schistosome dermatitis, a sensitization phenomenon. American Journal of Epidemiology 49: 290-302.
- Ortíz B., Bacilio M., Gorocica P., Montaña L. F., Garfias Y., Zenteno E. (2000):** The Hydrophobic Character of Peanut (*Arachis hypogaea*) Isoagglutinins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 6267-6270
- Pang P.C., Chiu P. C., Lee C. L., Chang L. Y., Panico M., Morris H. R., Haslam S. M., Khoo K. H., Clark G. F., Yeung W. S., Dell A. (2011):** Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. Science 333 (6050): 1761-1764.
- Paveley R. A., Aynsley S. A., Cook P. C., Turner J. D., Mountford A. P. (2009):** Fluorescent imaging of antigen released by a skin-invading helminth reveals differential uptake and activation profiles by antigen presenting cells. PLoS Neglected Tropical Diseases 3: e528 (1-14).
- Pearce E. J., Sher A. (1989):** Three major surface antigens of *Schistosoma mansoni* are linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol. The Journal of Immunology 142: 979-984.
- Podhorský M., Hůzová Z., Mikeš L., Horák P. (2009):** Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp. Acta Parasitologica 54: 28-36.
- Puchtler H., Meloan S. N., Terry M. S. (1969):** On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 17: 110-124.
- Rhodes J. M., Milton J. D. (1998):** Lectin Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine). University of Liverpool, UK, , Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Rizzatti E. G., Portieres F. L., Martins S. L., Rego E. M., Zago M. A., Falcao R. P. (2004):** Microgranular and t(11;17)/ PLZF-RARalpha variants of acute promyelocytic leukemia also present the flow cytometric pattern of CD13, CD34 and CD15 expression characteristic of PML-RARalpha gene rearrangement. American Journal of Hematology 76: 44–51.
- Robson R. T., Erasmus D. A. (1970):** The ultrastructure, based on Stereoscan observations, of the oral sucker of *Schistosoma mansoni* with special reference to penetration. Zeitschrift für Parasitenkunde 35: 76-86.
- Salter J. P., Choe Y., Albrecht H., Franklin C., Lim K. C., Craik C. S., McKerrow J. H. (2002):** Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes. The Journal of Biological Chemistry 277: 18-24.
- Salter J. P., Lim K.-C., Hansell E., Hsieh I., McKerrow J. H. (2000):** Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. The Journal of Biological Chemistry 275: 38667-38673.

Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1982): Loss of covalently labeled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of *Schistosoma mansoni*. The Journal of Cell Biology 94: 363-369.

Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1985): The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. The Journal of Cell Biology 100: 1423-1434.

Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1986): Cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni* activates human complement. Infection and Immunity 51 (1): 181-186.

Samuelson J. C., Stein L. D. (1989): *Schistosoma mansoni*: increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. Experimental Parasitology 69: 23-29.

Sauma S. Y., Strand M. (1990): Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked *Schistosoma mansoni* adult worm immunogens. Molecular and Biochemical Parasitology 38: 199-209.

Sharon N., Lis H. (2007): Lectins, 2nd edition. Springer.

Shiff C. J., Cmelik S. H. W., Ley H. E., Kriel R. L. (1972): The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. The Journal of Parasitology 58: 476-480.

Skelly P. J., Shoemaker C. B. (2000): Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. International Journal for Parasitology 30: 625-631.

Sobhon P., Upatham E. S. (1990): Snail hosts, life-cycle, and tegumental structure of oriental schistosomes. UNDP/WORD BANK/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, Switzerland.

Spooncer E., Fukuda M., Klock J. C., Oates J. E., Dell A. (1984): Isolation and characterization of polyfucosylated lactosaminoglycan from human granulocytes. The Journal of Biological Chemistry 259: 4792-4801.

Stein P. C., Lumsden R. D. (1973): *Schistosoma mansoni*: topochemical features of cercariae, schistosomula, and adults. Experimental Parasitology 33: 499-514.

Stirewalt M. A., Kruidenier F. J. (1961): Activity of the acetabular secretory apparatus of cercariae of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions: Experimental Parasitology 11: 191-211.

Stirewalt M. A., Walter M. (1973): *Schistosoma mansoni*: Histochemical analysis of the postacetabular gland secretion of cercariae. Experimental Parasitology 33: 61-72.

Turner M. W. (2003): The role of mannose-binding lectin in health and disease. Molecular Immunology 40: 423-429.

van de Roemer A. and Haas W. (1984): Fine structure of a lens-covered photoreceptor in the cercaria of *Trichobilharzia ocellata*. Zeitschrift für Parasitenkunde 70: 391-394.

van de Wetering J. K., van Golde L. M. G., Batenburg J. J. (2004): Collectins: Players of the innate immune system. European Journal of Biochemistry 271: 1229-1249.

van Remoortere A., Hokke C. H., van Dam G. J., van Die I., Deelder A. M., van der Eijnden D. H. (2000): Various stages of *Schistosoma* express Lewis^x, LacdiNAc, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc and GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. Glycobiology 10: 601-609.

Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999): Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wagner S., Lynch N. J., Walter W., Schwaeble W. J., Loos M. (2003): Differential expression the murine mannose-binding lectins A and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. Journal of Immunology 170: 1462-1465.

Wang K.-Y., Kuhlenschmidt T. B., Lee Y. C. (1985): Isolation and characterization of the major mannose-binding protein in chicken serum. Biochemistry 24: 5932-5938.

Weiss J. B., Magnani J. L., Strand M. (1986): Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. The Journal of Immunology 136: 4275-4282.

Wiest P. M., Kossmann R. J., Tartakoff A. M. (1989): Determinants of surface membrane maturation during the cercarial-schistosomula transformation of *Schistosoma mansoni*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41: 70-77.

Wiest P. M., Tartakoff A. M., Aikawa M., Mahmoud A. A. (1988): Inhibition of surface membrane maturation in schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 85: 3825-3829.

Wilson R. A., Barnes P. E. (1977): The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 74: 61-71.

Wuhrer M., Dennis R. D., Doenhoff M. J., Lochnit G., Geyer R. (2000): *Schistosoma mansoni*: cercarial glycolipids are dominated by Lewis X and pseudo-Lewis Y structures. Glycobiology 10: 89-101.

Xu X. F., Stack R. J., Rao N., Caulfield J. P. (1994): *Schistosoma mansoni*: fractionation and characterization of the glycocalyx and glycogen-like material from cercariae. Experimental Parasitology 79: 399-409.

www.vectorlabs.com